Molekularbiologische und biochemische Charakterisierung von *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*

Der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg
zur
Erlangung des Doktorgrades Dr. rer. nat.

vorgelegt von
Eva Maria Hiery

aus Nürnberg

Als Dissertation genehmigt von der Naturwissen-
schaftlichen Fakultät der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg

Tag der mündlichen Prüfung: 26.07.2013

Vorsitzender des
Promotionsorgans: Prof. Dr. Johannes Barth

Gutachter: Prof. Dr. Andreas Burkovski

PD Dr. Frederik Börnke

Danksagung

Ein großer Dank gilt Prof. Dr. Andreas Burkovski für die Bereitstellung eines sehr interessanten und vielseitigen Themas, die guten Tipps und Vorschläge, die immer offene Tür und das immer offene Ohr, für die Geduld beim Korrekturlesen der Arbeit und für die Begutachtung dieser. Ein weiterer Dank geht an PD Dr. Frederik Börnke für die Übernahme des Zweitgutachtens dieser Arbeit.

Ein weiterer Dank geht an Prof. Dr. R. Eichenlaub für die Bereitstellung des Wildtypstammes *Cmm*382, des plasmidfreien Stammes *Cmm*100 und des Plasmids pDM302.
Ich möchte mich ganz herzlich bei dem Lehrstuhl für Biochemie bedanken, für die Herzlichkeit und die große Hilfsbereitschaft und für die Bereitstellung der Tomaten- und Tabakpflanzen sowie die Nutzung des Gewächshauses. Ein besonderer Dank gilt dabei Christine, Stephen, Nurcan, Anja, Christiane und natürlich Dr. Sophia Sonnewald, die mir als meine Mentorin immer mit Rat und Tat zur Seite stand und mich durch den Wirrwarr der Microarray-Auswertungen geführt hat.

Ein großes Dankeschön geht an den Lehrstuhl für Mikrobiologie für eine gute Zusammenarbeit sowie aufmunternde und nette Gespräche auf den Gängen. Besonders möchte ich mich bei Susanne Morbach bedanken, für die Hilfe und gute Organisation, außerdem bei Frau Wehr, Manu, Markus, Gerald, Toni und Corny für ihre Hilfe bei verschiedensten Problemen. Danke Kati, Julia und Alex für die Geduld bei etlichen Klonierungen, Kultivierungen und Pflanzeninfektionen während eurer Zulassungsarbeit. Danke Susanne für den Fleiß und die Geduld bei den unzähligen Wachstumsexperimenten bei der Anpassung des XVM2-Mediums an das Xylem. Danke Maíra für deine Hilfe bei den Experimenten für die Charakterisierung eines Transkriptionsregulators sowie für deine Hilfsbereitschaft und Liebenswürdigkeit. Der größte Dank geht aber an das Burkovski-Labor. Danke Kristin, Nadine und Nadja für zahlreiche Tipps und für die Aufwertung des Arbeitsalltags. Ihr seid alle drei einfach tolle Menschen, die ich in den letzten Monaten/Jahren sehr vermisst habe. Danke Elena und Lisa für die super Zusammenarbeit im Labor und für die geduldige Korrektur meiner Arbeit. Danke Elena für Crêpes, Himbeer-Tiramisu und deine Hilfsbereitschaft. Danke Lisa für deine kreative Ader, deine große Offenheit und Aufgeschlossenheit und die Bereitstellung deines Gartens.

Ein weiterer großer Dank gilt meinen Freunden außerhalb der Arbeit, die mich während des Schreibens ertragen haben und für Ablenkung gesorgt haben. Hier ein besonderer Dank an Kristin, Jule und Judith für eine der besten Zeiten meines Lebens in der Villa. Danke Manu für den tollsten Bruder auf der Welt und Mama und Papa für eure umfassende Unterstützung. Ohne so tolle Menschen wie euch wäre das alles nicht möglich gewesen. Ein riesengroßes Dankeschön geht natürlich an meinen Freund Frank! Für die geduldige Korrektur dieser Arbeit, das gemeinsame Erleben von Hoch- und Tief-Zeiten und für viele beruhigende Worte. Ich bin froh, dass es dich gibt!

Inhaltsverzeichnis

1 Zusammenfassung 1
1 Summary 3
2 Einleitung 5
2.1 Pflanzen-Bakterien-Interaktion 5
2.1.1 Infektionsverlauf 5
2.1.2 Evolutionsbedingte Anpassung von Pflanze und Bakterium 6
2.2 Virulenzfaktoren phytopathogener Bakterien 8
2.2.1 Virulenzfaktoren in Gram-negativen Bakterien 9
2.2.2 Virulenzfaktoren in Gram-positiven Bakterien 9
2.2.3 Methoden zur Charakterisierung und Analyse von Virulenzfaktoren 11
2.3 Die Gattung *Clavibacter* 11
2.3.1 Von der Gattung *Corynebacterium* zur Gattung *Clavibacter* 11
2.3.2 *Clavibacter michiganensis* 12
2.4 *C. michiganensis subsp. michiganensis* 13
2.4.1 Infektion von Tomatenpflanzen 15
2.4.2 Virulenzfaktoren in *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* 18
2.4.3 Molekularbiologische Methoden 19
2.5 Zielsetzung der Arbeit 20
3 Material und Methoden 22
3.1 Bakterienstämme, Plasmide und Oligonukleotide 22
3.2 Nährmedien, Kultivierungs- und Infektionsbedingungen 25
3.2.1 Nährmedien für *E. coli* und *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* 25
3.2.2 Kultivierungsbedingungen für *E. coli* 26
3.2.3 Kultivierungsbedingungen für *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* 27
3.2.4 Infektion von Tomatenpflanzen 27
3.2.4.1 Wurzelinfektion 27
3.2.4.2 Petiolusinfektion 28
3.2.4.3 Sameninfektion 28
3.2.5 Infektion von Tabakpflanzen 29
3.2.6 Isolierung des Xylemsaftes aus Tomatenpflanzen 29
3.3 Molekularbiologische Techniken 29
3.3.1 DNA-Techniken 29
3.3.1.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* 30
3.3.1.2 Isolierung chromosomaler DNA aus *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* 30
3.3.1.3 Polymerase-Kettenreaktion 30
3.3.1.4 Restriktion von DNA 32
3.3.1.5 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA 33
3.3.1.6 Ligation von DNA 33
3.3.1.7 DNA-Sequenzierung 34
3.3.1.8 DNA-Sondenherstellung und -test 34
3.3.1.9 DNA-Hybridisierung (*Southern Blot*) 35
3.3.2 RNA-Techniken 37
3.3.2.1 RNA-Isolierung aus C. michiganensis subsp. michiganensis 37
3.3.2.2 RNA-Isolierung aus *N. tabacum* cv. Samsun NN 37
3.3.2.3 Gelelektrophoretische Auftrennung von RNA 38
3.3.2.4 Herstellung von RNA-Sonden mittels *in vitro*-Transkription 38
3.3.2.5 RNA-Hybridisierung (*Dot Blot*) 39
3.3.2.6 Quantitative *real-time* reverse Transkriptase PCR (qPCR) 40
3.3.2.7 cDNA-Microarrays 42
3.3.2.8 5'-RACE 43
3.3.2.9 RNA-Sequenzierung 43
3.4 Biochemische Techniken 44
3.4.1 Analyse der Ammoniumkonzentration 44

3.4.2 Analyse der Nitratkonzentration 44
3.4.3 Analyse der Zucker- und Aminosäurenkonzentration 44
3.4.4 Proteinisolierung aus *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* 45
3.4.4.1 Isolierung der Oberflächenproteine 45
3.4.4.2 Isolierung extrazellulärer und zytoplasmatischer Proteine 46
3.4.4.3 Isolierung spezifischer Proteine mittels *magnetic beads* 46
3.4.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) 48
3.4.6 2D-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (2D-PAGE) 49
3.4.7 Färbung mit Coomassie *Brilliant Blue* 50
3.4.8 Zymographie 51
3.4.9 Vorbereitung der Proteine zur Analyse mittels MALDI-ToF MS 52
3.4.10 Protein-Hybridisierung (*Western Blot)* 52
3.5 Techniken zur Manipulation von Bakterien 54
3.5.1 Herstellung kompetenter *E. coli* DH5αMCR 54
3.5.2 Transformation kompetenter *E. coli* DH5αMCR 54
3.5.3 Herstellung kompetenter *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* 54
3.5.4 Transformation kompetenter *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* 55
3.5.5 Insertionsmutagenese in *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* 55
3.5.6 Fluoreszenzmessung 55
4 Ergebnisse 57
4.1 Wachstumsverhalten von *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* 57
4.2 Infektion von Tabakpflanzen 58
4.2.1 Phänotypische Analyse der *Nicotiana*-Infektion 58
4.2.2 Molekulare Analyse der *Nicotiana*-Infektion 60
4.3 Infektion von Tomatenpflanzen 64
4.3.1 Analyse von Krankheitssymptomen 65
4.3.2 Analyse der Samenbesiedelung in infizierten Tomatenpflanzen 66
4.3.3 Analyse der Samenbesiedelung nach einer *in vitro*-Infektion 68
4.4 Analyse von Virulenzfaktoren 70
4.4.1 Xylemsaft-imitierendes *in vitro*-Medium (XMM) 71
4.4.2 Proteomanalysen 74
4.4.2.1 Analyse der Oberflächenproteine 74
4.4.2.2 Analyse extrazellulärer und zytoplasmatischer Proteine 78
4.4.3 Transkriptomanalysen 85
4.4.3.1 Vergleich: synthetisches Medium (XMM) und Minimalmedium (M9) 86
4.4.3.2 Vergleich: synthetisches Medium (XMM) und Vollmedium (TBY) 90
4.4.3.3 Vergleich: synthetisches Medium (XMM) mit und ohne Acetosyringon 92
4.5 Charakterisierung und Analyse von Transkriptionsregulatoren 94
4.5.1 Charakterisierung von Regulatoren für *pat-1* und *celA* 94
4.5.2 Insertionsmutagenese von drei putativen Regulatoren 96
4.5.3 Analyse der Mutation von CMM_2408 und CMM_2766 101
4.6 Promotorstudien 103
4.6.1 Analyse der Promotorregion von *glnA1* 104
4.6.2 Promotoranalyse des 5'-Transkriptoms mittels RNA-Sequenzierung 106
5 Diskussion 112
5.1 Interaktion von Nicht-Wirts- und Wirts-Pflanze mit *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* 112
5.1.1 Interaktion mit der Nicht-Wirts-Pflanze *Nicotiana* 112
5.1.2 Interaktion mit der Wirts-Pflanze *S. lycopersicum* 114
5.2 Das synthetische Xylemsaft-imitierende Medium XMM 116
5.3 Das extrazelluläre Proteom von *Cmm*382 in M9- und XMM-Medium 118
5.4 Das Transkriptom von *Cmm*382 in unterschiedlichen Medien 121
5.5 Proteom- und Transkriptomdaten - Ein Vergleich 123
5.6 Putative Transkriptionsregulatoren von *pat-1* und *celA* 124
5.7 Homologe Sequenzen innerhalb des Genoms von *Cmm*382 125
5.8 Analyse der 5'-Transkripte mittels RNA-Sequenzierung 126
6 Literaturverzeichnis 129

7 Anhang 142
7.1 Plasmidkonstruktion 142
7.2 MALDI-ToF MS-Daten des extrazellulären Proteoms von *Cmm*382 144
7.3 MALDI-ToF MS-Daten des zytoplasmatischen Proteoms von *Cmm*382 151
7.4 Microarray-Daten des Transkriptoms von *Cmm*382 161
7.5 MALDI-ToF-Daten der Analyse von Transkriptionsregulatoren von *Cmm*382 197
7.6 RNA-Sequenzierung des gesamten 5'-Transkriptoms von *Cmm*382 in M9- und TBY-Medium 199

Gentabelle

Tabelle 1: Putative Virulenzgene sowie weitere in dieser Arbeit verwendeten Gene und deren Annotation in *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Quelle: Flügel *et al.,* 2012; SMART EMBL, Heidelberg). SP: Signalpeptid, TMD: Transmembrandomäne, NV: nicht vorhanden. "---": nicht analysiert.

Name	Lokus	Mögliche Funktion	SP oder TMD
celA	pCM1_0020	Cellulase	TMD
celB	CMM_2443	Cellulase, putatives Pseudogen	SP
chpA'	CMM_PSEUDO_08 CMM_PSEUDO_09 CMM_PSEUDO_10	extrazelluläre Serinprotease, Pseudogen	---
chpB'	CMM_PSEUDO_17 CMM_PSEUDO_18	extrazelluläre Serinprotease, Pseudogen	---
chpC	CMM_0052	extrazelluläre Serinprotease	NV
chpD'	CMM_PSEUDO_05 CMM_PSEUDO_06 CMM_PSEUDO_07	extrazelluläre Serinprotease, Pseudogen	---
chpE	CMM_0039	extrazelluläre Serinprotease	SP
chpF	CMM_0053	extrazelluläre Serinprotease	TMD
chpG	CMM_0059	extrazelluläre Serinprotease	SP, TMD
gapA	CMM_1744	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase	NV
glnA1	CMM_1636	Glutaminsynthetase I	NV
glnR	CMM_2501	Transkriptionsregulator	NV
pat-1	pCM2_0054	extrazelluläre Serinprotease	SP, TMD
pelA1	CMM_0043	Pektat-Lyase	TMD
pelA2	CMM_0051	Pektat-Lyase	SP, TMD
pfkA	CMM_0604	6-Phosphofructokinase	NV
pgaA	CMM_2871	Polygalacturonase	SP
phpA	pCM2_0053	extrazelluläre Serinprotease	SP, TMD
phpB	pCM2_0052	extrazelluläre Serinprotease	SP, TMD
ppaA	CMM_0041	extrazelluläre Serinprotease	NV
ppaB1	CMM_0042	extrazelluläre Serinprotease	SP, TMD
ppaB2	CMM_0050	extrazelluläre Serinprotease	SP, TMD
ppaC	CMM_0044	extrazelluläre Serinprotease	TMD
ppaD	CMM_0075	extrazelluläre Serinprotease	SP
ppaE	CMM_0071	extrazelluläre Serinprotease	TMD
ppaF	CMM_0764	extrazelluläre Serinprotease	TMD
ppaG	CMM_1942	extrazelluläre Serinprotease	SP, TMD
ppaH	CMM_1947	extrazelluläre Serinprotease	SP, TMD

Name	**Lokus**	**Mögliche Funktion**	**SP oder TMD**
ppaI	CMM_1948	extrazelluläre Serinprotease	SP, TMD
ppaJ	pCM1_0023	extrazelluläre Serinprotease	SP
sbtA	CMM_0070	Subtilisin-ähnliche extrazelluläre Serinprotease	TMD
sbtB	CMM_2535	Subtilisin-ähnliche extrazelluläre Serinprotease	TMD
sbtC	CMM_2536	Subtilisin-ähnliche extrazelluläre Serinprotease	SP
tomA	CMM_0090	Endo-1,4-*β*-Glycosidase (Tomatinase)	SP, TMD
xylA	CMM_0882	Xylose-Isomerase	NV
xysA	CMM_1673	Endo-1,4-*β*-Xylanase A	TMD
xysB	CMM_1674	Endo-1,4-*β*-Xylanase B	NV
---	CMM_0504	Phospholipase C	NV
---	CMM_2382	Perforin	NV
---	CMM_2408	Transkriptionsregulator, IclR-Familie	---
---	CMM_2691	Endoglucanase	SP, TMD
---	CMM_2692	Endoglucanase	TMD
---	CMM_2766	2-Komponenten-System, Antwort-Regulator	---
---	pCM2_0056	Transkriptionsregulator	---

1 Zusammenfassung

Clavibacter michiganensis subsp. *michiganensis* dringt über natürliche Öffnungen und Verwundungen in seine Wirts-Pflanze *Solanum lycopersicum* (Tomate) ein, verbreitet sich dort systemisch über die Xylemgefäße und verursacht Krankheitssymptome wie Blattwelke und Stängelläsion. Die *in vivo*-Analyse von Virulenzfaktoren, die an der Wirt-Pathogen-Interaktion beteiligt sind, wäre ideal, ist jedoch technisch äußerst schwierig. Außerdem wird die Analyse einer Infektion mit *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* zum einen durch eine mögliche Latenzzeit der Bakterien erschwert, zum anderen durch uneinheitlich auftretende Krankheitssymptome. Aus diesem Grund war ein zentrales Thema dieser Arbeit die Etablierung eines synthetischen Xylemsaft-imitierenden Mediums zur *in* vitro-Analyse von Virulenzfaktoren von *C. michiganensis* subsp. *michiganensis.*

Um die natürliche pflanzliche Umgebung *in vitro* widerzuspiegeln, wurde das Apoplasten-Medium XVM2, in dem Virulenzfaktoren von *Xanthomonas* eine erhöhte Expression zeigten (Wengelnik *et al.*, 1996), an den Lebensraum von *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* angepasst. Dazu wurde zunächst die Zusammensetzung des Xylemsaftes analysiert und anschließend, basierend auf dem XVM2-Medium, ein Xylemsaft-imitierendes *in vitro*-Medium (XMM) etabliert. Ein Vergleich des Proteoms und Transkriptoms von *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* in diesem synthetischen Medium (XMM) und einem Minimalmedium zeigte keine erhöhte Konzentration von Virulenzfaktoren im XMM-Medium, dafür jedoch eine erhöhte Transkriptmenge von Genen, die für Transporter kodieren. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass das XMM-Medium die Bedingungen im nährstoffarmen Xylemsaft in einem frühen Stadium der bakteriellen Infektion imitiert, in dem vermutlich das Hauptziel der Bakterien die Nährstoffaufnahme, das Wachstum und die Ausbreitung ist.

Für *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* wurde eine Analyse der Regulation und der Promotorregionen von Virulenzgenen noch nicht oder nur in ersten Ansätzen durchgeführt (Dreier *et al.*, 1997; Jahr *et al.*, 2000). Aus diesem Grund waren die Identifizierung putativer Regulatoren für die beiden am besten charakterisierten Virulenzgene *pat-1* und *celA* und die Analyse von Promotorregionen mittels RNA-Sequenzierung weitere Ziele dieser Arbeit. Die Analyse putativer Regulatoren wurde dabei durch homologe Sequenzen zwischen dem bakteriellen Chromosom und den beiden natürlichen Plasmiden erschwert. Die Genprodukte von CMM_2408 und CMM_2766 wurden als Regulatoren von *pat-1*, welches für eine Serinprotease kodiert, identifiziert und greifen vermutlich als Repressoren in die Regulation der *pat*-1-Genexpression ein. Des Weiteren wurden bei der Analyse von 48 Promotorregionen konservierte Bereiche in der -10-Region und der Shine-Dalgarno-Sequenz identifiziert, jedoch nicht in der -35-Region.

Neben der Wirt-Pathogen-Interaktion wurde in dieser Arbeit außerdem die Interaktion mit der Nicht-Wirts-Pflanze *Nicotiana tabacum* (Tabak) analysiert. Diese inkompatible (nicht-erfolgreiche) Interaktion konnte phänotypisch und in ersten Ansätzen auch auf molekularer Ebene gezeigt werden. Das beobachtete nekrotische Blattgewebe und die erhöhte Transkriptmenge des Gens *hsr203J* nach der bakteriellen Infektion weisen auf eine hypersensitive Antwort der Pflanze hin. Die dadurch normalerweise hervorgerufene Inhibierung des bakteriellen Wachstums war in dieser Arbeit jedoch bis zu 72 Stunden nach der Infektion nicht erkennbar.

1 Summary

Clavibacter michiganensis subsp. *michiganensis* is a Gram-positive bacterium which penetrates its host plant *Solanum lycopersicum* (tomato) through natural openings or wounds. It spreads out through the xylem vessels and triggers disease symptoms like wilting of the leaves and canker of the stem. Virulence factors play an important role during the host-pathogen interaction. The analysis of these virulence factors *in vivo* would be ideal, but is technically difficult. Furthermore, the putative latency of the bacteria as well as the inconsistent appearance of disease symptoms impede the analysis of the infection with *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*. For this reason, the establishment of a synthetic xylem mimicking medium to analyse virulence factors of *C. michiganensis* subsp. *michiganensis in vitro* was a central issue in this work.

To reflect the natural plant environment of *C. michiganensis* subsp. *michiganensis in vitro*, the apoplast medium XVM2, in which virulence factors of *Xanthomonas* showed an increased expression (Wengelnik *et al.*, 1996), was adapted to the xylem. At first, the composition of the xylem sap was analysed and the establishment of a xylem mimicking medium (XMM) based on the XMV2 medium followed. A comparison of the proteome and transcriptome of *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* in this XMM medium and a minimal medium showed no increased amount of virulence factors in XMM medium but an increased transcript amount of genes coding for transporter. These results suggest that the XMM medium mimics the conditions in the nutrient poor xylem at an early stage of infection. Here, the main aims of the bacteria are nutrient uptake, growth and spreading in the plant.

For *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*, the analysis of the regulation and of promoter regions of virulence genes was not carried out until now or only in first experiments (Dreier *et al.*, 1997; Jahr *et al.*, 2000). Therefore, the identification of proteins which are involved in the regulation of virulence gene expression as well as the characterization of a consensus sequence for specific promoter structures was another main goal of this work. Homologue sequences between the chromosome and the two natural plasmids made the analyses difficult. The two gene products of CMM_2408 and CMM_2766 were found to be involved in the regulation of *pat-1* gene expression as repressor proteins. In addition, the analysis of 48 promoter regions led to conserved nucleotides in the -10-region and the Shine-Dalgarno-sequence, but not in the -35-region.

Beside the host-pathogen interaction, the analysis of the non-host interaction between *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* and *Nicotiana tabacum* (tobacco) was also part of this work. This incompatible interaction was shown phenotypical and in first experiments on a molecular level. The observed necrotic leaf tissue and the increased transcript amount of *hsr203J* after the

bacterial infection indicate a hypersensitive response of the plant as an answer to the infection. Usually, the inhibition of the bacterial growth is also part of the hypersensitive response. In this work, the growth of *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* up to 72 hours after infection was not affected.

2 Einleitung

2.1 Pflanzen-Bakterien-Interaktion

Im Jahr 2012 wurden weltweit insgesamt 20 Millionen Tonnen der Nutzpflanzen Reis, Mais und Weizen produziert (Quelle: *Food and Agriculture Organization*: FAO). Trotzdem gelten noch 12 % der Weltbevölkerung, vor allem in Entwicklungsländern, als unterernährt (Quelle: FAO). Die Ernteerträge werden unter anderem durch abiotischen Stress (Veränderung von Bodenbeschaffenheit, Klima und Temperatur) und biotischen Stress (Schädigung durch lebende Organismen) vermindert (Rietz & Parker, 2007). Viren, Viroide, Pilze, Oomyceten und Bakterien zählen zu den Auslösern des biotischen Stresses.

2.1.1 Infektionsverlauf

Um sich vor dem Eindringen von schädlichen Organismen zu schützen, besitzen Pflanzenzellen natürliche Barrieren, wie zum Beispiel die Epidermis mit der robusten Kutikula und die Zellwand (Rietz & Parker, 2007). Bakterien können diese Barrieren nicht einfach durchdringen, sondern gelangen über Wunden oder natürliche Öffnungen in die Wirtspflanze. Stomata und die Stomata-ähnlichen Hydathoden stellen solche natürlichen Öffnungen dar. Hydathoden sind Drüsen an der Blattspitze, die permanent offen sind. Bei hoher Luftfeuchtigkeit werden darüber Wassertropfen abgesondert, die bei niedriger Luftfeuchtigkeit wieder in das Innere der Pflanze gelangen. Mit diesen Tropfen können Bakterien leicht in die Pflanze eindringen (Ryan *et al.*, 2011; Gu *et al.*, 2013). Ein Eindringen der Bakterien in den Pflanzensamen über den Pollenschlauch, Verletzungen der Samenhülle oder über die Micropyle ist ebenfalls möglich (Mundt & Hinkle, 1976; Morohashi, 2002). Die Micropyle ist ein Bereich des Samens, durch den die ersten Wurzeln die schützende Samenhülle bei der Keimung verlassen (Morohashi, 2002). Eine weitere Möglichkeit, um in die Pflanze zu gelangen, ist die Übertragung durch einen tierischen Vektor, zum Beispiel ein Insekt (Hogenhout & Loria, 2008). Eine Anpassung an die zum Teil limitierten Bedingungen in der Pflanze wurde im Laufe der Evolution beispielsweise durch eine Genomreduktion oder einen horizontalen Gentransfer ermöglicht (Hogenhout & Loria, 2008). Dadurch war es den Bakterien möglich, im Blatt- (Palisaden- und Schwammgewebe), Stängel- (kortikales Parenchym und Xylem) und Wurzelgewebe (kortikales Parenchym, Xylem und Phloem) zu überleben (Setubal *et al.*, 2005; Francis *et al.*, 2010). Die dortige Versorgung des Bakteriums mit Nährstoffen kann auf unterschiedliche Weise erfolgen. Einige Bakterien, wie zum Beispiel die Gattung *Bacillus*, gehen mit der Wirts-Pflanze eine Symbiose ein (Francis *et al.*, 2010). Andere Bakterien sekretieren hydrolytische Enzyme, die eine Lyse der Pflanzenzelle

hervorrufen und dadurch für ein besseres Nährstoffangebot sorgen. Das Bakterium wird dabei als pathogen bezeichnet, da es Schäden in der Pflanze hervorruft. Kommt es bei dieser Wirt-Pathogen-Interaktion zur Ausbildung von Krankheitssymptomen, ist die Pflanze anfällig (suszeptibel) und die Wirt-Pathogen-Interaktion kompatibel (Pontier *et al.*, 1998). Wird eine pathogene Infektion verhindert, ist die Pflanze resistent und die Wirt-Pathogen-Interaktion inkompatibel (Pontier *et al.*, 1998). Wenn der Befall im pflanzlichen Wirt Krankheitssymptome auslöst, werden die Bakterien als phytopathogen oder virulent bezeichnet (Rietz & Parker, 2007).

Ein Beispiel für Krankheitssymptome ist die Chlorose, bei der es zu einer Gelbfärbung der Blätter kommt. Hervorgerufen wird dies durch eine anormale Akkumulation von Glucose im Phloem zum Beispiel aufgrund bakterieller Toxine (Hogenhout & Loria, 2008). Ein weiteres Symptom ist die Blattwelke, die durch eine Verstopfung vaskulärer Gefäße aufgrund einer bakteriellen Aggregation hervorgerufen werden kann. Des Weiteren kann es zu einer Zerstörung des Stängelgewebes durch bakterielle hydrolytische Enzyme kommen. Diese greifen die Bestandteile der pflanzlichen Zellwand - Cellulose, Hemicellulose, Pektin sowie Lignin - an, was zu Läsionen und offenen Wunden im Stängel führt (Rietz & Parker, 2007). Als weiteres Beispiel für Krankheitssymptome kommt es bei einer Infektion mit *Agrobacterium tumefaciens* zu einer Störung der Phytohormon-Balance und dadurch zu einer unkontrollierten Pflanzenzellteilung (Tumorbildung) (Rietz & Parker, 2007).

2.1.2 Evolutionsbedingte Anpassung von Pflanze und Bakterium

Eindringende pathogene Bakterien werden von der Pflanze über spezifische Rezeptoren erkannt, die an bakterielle Pathogen-assoziierte molekulare Muster (*pathogen associated molecular pattern:* PAMPs) binden. PAMPs sind Proteine, die auf der bakteriellen Oberfläche lokalisiert sind oder vom Bakterium in die Umgebung abgegeben werden (Abbildung 1). Die Rezeptor-PAMP-Interaktion aktiviert Signalkaskaden (MAPK-Signalkaskaden), wodurch die pflanzliche Genexpression verändert wird. Dadurch werden Proteine gebildet, die eine Rolle bei basalen Abwehrreaktionen spielen. Diese Abwehrreaktionen sind vergleichbar mit denen des angeborenen Immunsystems bei Tieren (Rietz & Parker, 2007). Pathogen-betreffende (*pathogen related:* PR) Proteine, Verteidigungsenzyme und Phytohormone sind dabei entscheidend. Durch sie wird gewährleistet, dass lokal aber auch systemisch Abwehrreaktionen aktiviert werden, um Nachbarzellen vor Angriffen durch Pathogene zu warnen (Vera *et al.*, 2011). Die Verteidigungsenzyme Phenylalanin-Ammoniak-Lyase (PAL) und Lypoxygenase (LOX) akkumulieren Phenylpropanoid-Verbindungen und Oxylipine, die eine antibakterielle Aktivität besitzen (Vera *et al.*, 2011). Um die pflanzlichen Abwehrreaktionen zu unterbinden, sekretieren Bakterien Proteine, die in das Zytoplasma der

Pflanzenzelle geschleust werden und dort als Effektoren wirken (Abbildung 1; Rietz & Parker, 2007). Der Transport von Effektoren in das Zytoplasma der Pflanze erfolgt in Gram-negativen Bakterien über Sekretionssysteme. In Gram-positiven Bakterien ist der Mechanismus des Transports noch unklar (Hogenhout & Loria, 2008). Effektoren interagieren im Zytoplasma mit dem Erkennungs- und Abwehrmechanismus der Pflanze, wodurch eine erfolgreiche Infektion gewährleistet ist (Pontier *et al.*, 1998; Bonas *et al.*, 2000).

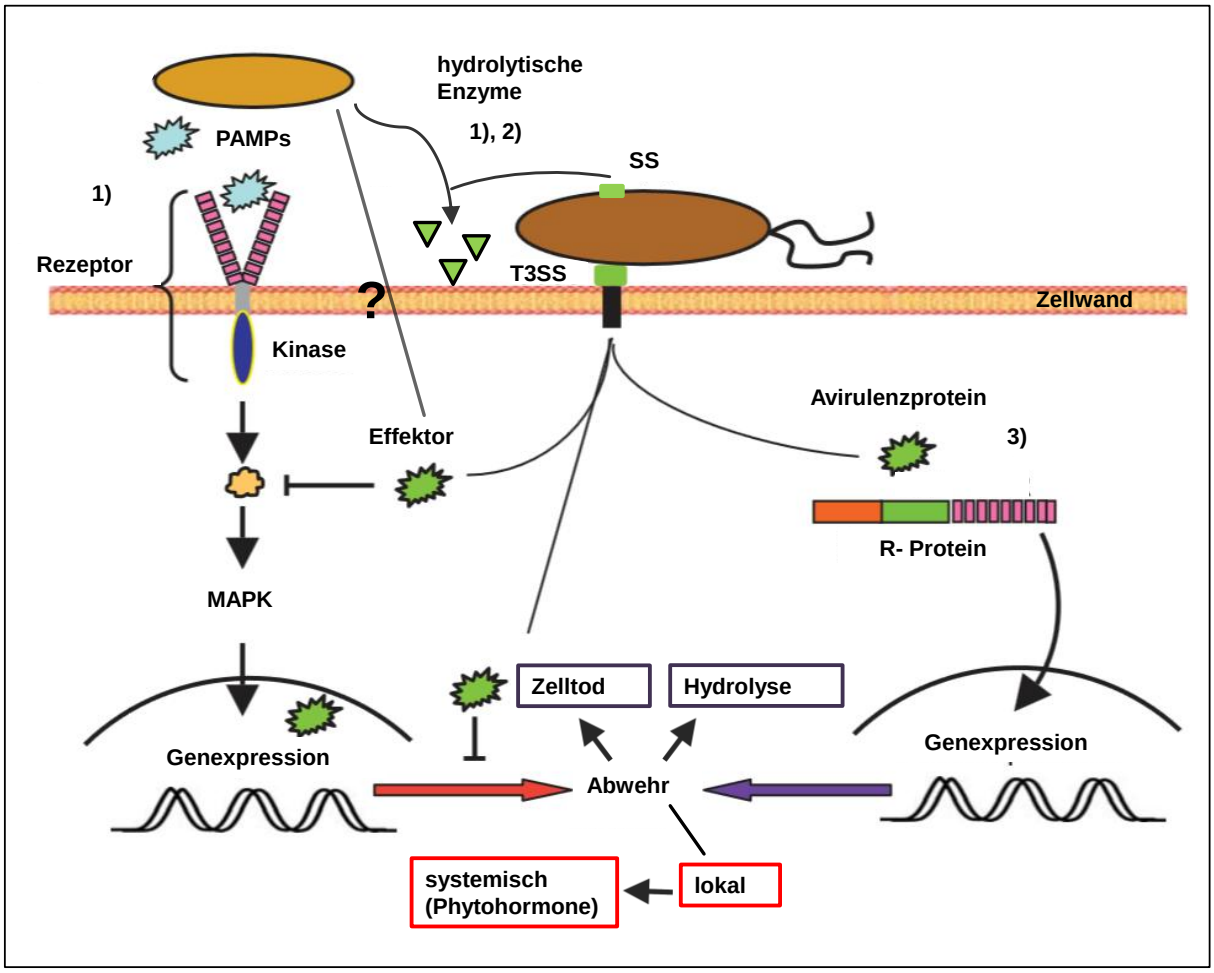


Abbildung 1: Wechselseitige evolutionäre Anpassung von Pflanze und Bakterium. **1)** Die Pflanzenzelle erkennt mittels spezifischer Rezeptoren Pathogen-assoziierte molekulare Muster (PAMPs) wie bakterielle Oberflächenstrukturen oder sekretierte Proteine. Die Erkennung führt zu einer basalen Abwehr, die sowohl lokal als auch systemisch abläuft. **2)** Über Sekretionssysteme (SS) oder noch unbekannte Mechanismen gelangen bakterielle Proteine (Effektoren) in das pflanzliche Zytoplasma. Dort greifen sie an unterschiedlichen Stellen in die pflanzliche Erkennungs- und Abwehrmechanismen ein. **3)** Resistente Pflanzen erkennen über Rezeptor-Proteine (R) spezifisch bakterielle Effektoren (Avirulenzproteine). Dadurch wird erneut eine Abwehrreaktion hervorgerufen. Das Wachstum des Pathogens wird durch seine Hydrolyse oder einen lokalen Pflanzenzelltod inhibiert. T3SS: Typ3-SS, MAPK: Mitogen-assoziierte Proteinkinase. Modifiziert nach (Rietz & Parker, 2007; Savidor *et al.*, 2012). (Jones & Dangl, 2006; Büttner & Bonas, 2010; Vera *et al.*, 2011).

Einen weiteren Schutz der Pflanze vor Pathogenen bieten Immunrezeptoren (R-Proteine) im Zytoplasma, die spezifisch bakterielle Effektormoleküle (Avirulenzproteine) erkennen. Die Erkennung läuft entweder direkt ab oder erfolgt indirekt über Reaktionsprodukte der Avirulenzproteine. Findet keine spezifische Erkennung statt, kann die Pflanze die Infektion nicht verhindern. Ist die Erkennung spezifisch, werden erneut pflanzliche Abwehrreaktionen aktiviert. Die Bakterien werden entweder durch antimikrobielle Proteine hydrolysiert oder das bakterielle Wachstum wird durch einen lokalen Pflanzenzelltod inhibiert (Abbildung 1; Rietz & Parker, 2007). Der Vorgang, der zum Pflanzenzelltod führt, wird als hypersensitive Antwort (*hypersensitive response*: HR) bezeichnet (Pontier *et al.*, 1998). Der lokale Zelltod kann aber auch ein Krankheitssymptom in suszeptiblen Pflanzen sein. Es ist jedoch nicht bekannt, ob es sich dabei um die gleichen Mechanismen handelt wie bei der HR in resistenten Pflanzen (Pontier *et al.*, 1998). Kommt es zu genetischen Veränderungen in den Avirulenzgenen, können die Avirulenzproteine nicht mehr von den entsprechenden R-Proteinen der Pflanze erkannt werden, es findet somit keine spezifische Interaktion statt. Durch natürliche Selektion können die R-Proteine so verändert werden, dass sie die Avirulenzproteine wieder erkennen (Jones & Dangl, 2006).

Die Interaktion von Gram-negativen Bakterien mit Pflanzen ist wesentlich besser untersucht als bei Gram-positiven Bakterien. Zu den Gram-negativen Proteobakterien zählen *Agrobacterium*-, *Erwinia*-, *Xanthomonas*-, *Ralstonia*- sowie *Pseudomonas*-Arten und *Pseudomonas*-Unterarten (Boch & Bonas, 2001). Zu den Gram-positiven Bakterien gehören zum Beispiel die Aktinobakterien-Gattungen *Clavibacter*, *Leifsonia*, *Rhodococcus* und *Streptomyces* und die Firmicute-Gattung *Spiroplasma* (Hogenhout & Loria, 2008). Das Wirtsspektrum kann dabei sehr groß sein, wie es zum Beispiel bei *Erwinia, Rhodococcus* und *Streptomyces* der Fall ist. Es reicht von landwirtschaftlich wichtigen Pflanzen wie Kartoffeln bis zu Modellorganismen wie *Arabidopsis*. Die Arten und Unterarten von *Pseudomonas, Clavibacter* und *Leifsonia* sind im Gegensatz dazu wirtsspezifisch (Hogenhout & Loria, 2008). Wichtig für die Wirtserkennung und -besiedelung sind bakterielle Virulenzfaktoren.

2.2 Virulenzfaktoren phytopathogener Bakterien

Zu den bekanntesten bakteriellen Virulenzfaktoren gehören Oberflächenstrukturen, wie extrazelluläre Polysaccharide, Adhäsine, Pili, Flagellen und Fimbrien sowie Proteine in Sekretionssystemen und sekretierte Enzyme (Büttner & Bonas, 2010). Die Expression von Virulenzgenen kann durch spezifische Proteine reguliert werden, die durch einen bestimmten Reiz die Genexpression bei einer Infektion aktivieren. Für einige Transkriptionsregulatoren der Familien OmpR (Bonas *et al.*, 2000), PidR (Karki *et al.*, 2012) und MarR (Wei *et al.*, 2007) ist eine Beteiligung an der bakteriellen Virulenz bekannt.

2.2.1 Virulenzfaktoren in Gram-negativen Bakterien

Gram-negative Bakterien können über Oberflächenstrukturen an die Wirtszelle adhärieren (Büttner & Bonas, 2010). Neben der Plasmamembran besitzen sie eine zweite äußere Membran, welche den Export von Proteinen erschwert. Daher werden Proteine über Sekretionssysteme (SS) aus der Zelle transportiert. Über das Typ4-SS (T4SS) wird zum Beispiel T-DNA aus *A. tumefaciens* in die Wirtszelle transportiert und dort über einen natürlichen Gentransfer in die Wirts-DNA eingebaut (Engström *et al.,* 1987; Büttner & Bonas, 2010). Die am Transport und Einbau beteiligten Gene werden erst mit Hilfe eines Signals exprimiert, das über die Phosphokinase VirA und den Regulator VirG übertragen wird. Solche Signale können phenolische Substanzen wie Acetosyringon sein, das von der Pflanze bei Verwundung ausgeschieden wird. Acetosyringon fungiert daneben ebenfalls als Lockstoff für Bakterien, da durch eine Verwundung das Eindringen in die Pflanze erleichtert wird (Engström *et al.*, 1987; Parke *et al.*, 1987). Auch bei *Pseudomonas*-Arten spielt Acetosyringon eine Rolle in der Wirt-Pathogen-Interaktion (Baker *et al.*, 2005). Über die Sekretionssysteme T1SS und T2SS werden extrazelluläre Proteine wie Phytotoxine oder hydrolytische Enzyme wie Cellulasen, Xylanasen, Pektat-Lyasen und Proteasen aus der Bakterienzelle transportiert (Boch & Bonas, 2001; Büttner & Bonas, 2010; Ryan *et al.*, 2011). Die Expression der verantwortlichen Gene wird zum Beispiel durch niedrige Temperatur oder phenolische Substanzen aktiviert (Boch & Bonas, 2001).

Über T3SS – und vermutlich noch andere Sekretionssysteme – werden Effektoren transportiert. Die Besonderheit dieser Sekretionssysteme besteht darin, dass sie nicht nur die bakterielle Zellwand überbrücken, sondern auch die pflanzliche Zellwand und Plasmamembran, sodass die Effektoren direkt in das Zytoplasma der Pflanzenzelle gelangen (Büttner & Bonas, 2010). Effektoren können dabei zum Beispiel Phytohormone sein, die in der Pflanze als Signalgeber fungieren. Ihre Rolle in der Pathogenität ist jedoch unklar (Boch & Bonas, 2001). Für einige Avirulenzgene (*avr*), zum Beispiel in *Xanthomonas*-Unterarten, ist bekannt, dass sie Krankheitssymptome in suszeptiblen Pflanzen auslösen (Boch & Bonas, 2001). *hrp*-Gene (*hypersensitive response: hrp*) kodieren für Proteine, die bei der Ausbildung einer HR und bei der Pathogenität des Bakteriums von Bedeutung sind (Alfano & Collmer, 1997; Bonas *et al.*, 2000; Büttner & Bonas, 2010). Dabei werden *hrp*-Gene nicht nur *in vivo*, sondern auch *in vitro* in Minimalmedium mit Congo Rot oder in einem Apoplasten-Medium (XVM2) für *Xanthomonas* verstärkt exprimiert (Wengelnik *et al.*, 1996; Guéneron *et al.*, 2000).

2.2.2 Virulenzfaktoren in Gram-positiven Bakterien

Als erstes Genom eines Gram-positiven Phytopathogens wurde 2004 das Genom von *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* vollständig sequenziert (Monteiro-Vitorello *et al.*, 2004). Bis 2010

folgte die Vervollständigung sieben weiterer Sequenzen; weitere Genome werden derzeit sequenziert (Francis *et al.*, 2010). Erst mit der verfügbaren Genomsequenz konnten Virulenzgene effektiver und schneller analysiert und charakterisiert werden. Um Effektoren in die Wirtszelle zu transportieren, müssen sich Bakterien an die Wirtszell-Oberfläche anheften. Über diese Adhäsion Gram-positiver Bakterien an die Wirtszelle ist wenig bekannt. *Streptomyces coelicolor* adhäriert über Fimbrien an Zelloberflächen (de Jong *et al.*, 2009). Die Genome von *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* und subsp. *sepedonicus*, *L. xyli* und *Streptomyces avermitilis* enthalten Gene, deren Genprodukte an der Synthese von Pili beteiligt sein könnten, die bei der Adhäsion eine Rolle spielen (http://cmr.jcvi.org). Da in Gram-positiven Bakterien kein T3SS vorhanden ist, um Effektoren ins pflanzliche Zytoplasma zu transportieren, müssen Effektoren auf andere Weise an ihren Zielort gelangen. *Streptomyces*-Arten exprimieren beispielsweise eine Salpetersäure-Synthase, die an der Thaxtomin-Produktion beteiligt ist. Thaxtomin inhibiert die Cellulose-Synthese in der pflanzlichen Zellwand, sodass vermutlich das Eindringen von Effektoren in die Pflanzenzelle erleichtert wird (Loria *et al.*, 2008; Francis *et al.*, 2010).

Virulenzgene sind in Gram-positiven Bakterien vorwiegend innerhalb sogenannter Pathogenitätsinseln lokalisiert, die wahrscheinlich über horizontalen Gentransfer in das bakterielle Genom eingebaut wurden. Pathogenitätsinseln weisen im Vergleich zum restlichen Genom einen niedrigeren G+C-Gehalt auf (Francis *et al.*, 2010). Neben dem Chromosom kommen oft natürliche Plasmide in linearer oder zirkulärer Form vor, auf denen ebenfalls Virulenzgene lokalisiert sind. Das Gen *tomA* kodiert für eine Tomatinase, die das pflanzliche Alkaloid *α*-Tomatin, welches das bakterielle Wachstum hemmt, unschädlich macht (Quidde *et al.*, 1998; Kaup *et al.*, 2005). *tomA*-Homologe liegen in den meisten Fällen innerhalb einer Pathogenitätsinsel und konnten in einigen phytopathogenen Bakterien identifiziert werden, zum Beispiel in *Streptomyces*-Unterarten (Kers *et al.*, 2005), *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* und subsp. *sepedonicus* (Bentley *et al.*, 2008) sowie in einem pathogenen Pilz (Kers *et al.*, 2005). Ein weiterer Virulenzfaktor ist Nec1, der Nekrose hervorruft und von *Streptomyces*-Arten sekretiert wird, um Abwehrreaktionen der Pflanze zu unterdrücken (Joshi *et al.*, 2007). *Spiroplasma*-Arten exportieren SAP11, das über eine Kernlokalisationssequenz in den Wirtskern gelangt und dort die Genexpression verändert (Hogenhout & Loria, 2008). Ebenso wie Gram-negative Bakterien besitzen Gram-positive Bakterien Gene, die für Phytohormone kodieren. *Rhodococcus fasciens* exprimiert zum Beispiel Cytokinin über das *fas*-Operon (Hogenhout & Loria, 2008) und *L. xyli* subsp. *xyli* Abscisinsäure (Monteiro-Vitorello *et al.*, 2004). Ein weiterer Virulenzfaktor ist die P450-Monooxygenase, die beispielsweise für die Virulenz in *R. fasciens* wichtig ist. Die P450-Monooxygenase ist außerdem an der Thaxtomin-Synthese in *S. acidiscabies* beteiligt sowie an der Biosynthese von Abscisinsäure in einem phytopathogenen Pilz (Healy *et al.*, 2002;

Siewers *et al.*, 2004). Cellulasen sind wichtige hydrolytische Enzyme für phytopathogene Bakterien, da sie die Cellulose in der pflanzlichen Zellwand abbauen. Dabei werden *β*-1,4-glucosidische Bindungen gespalten, weshalb sie auch *β*-1,4-Glucanasen bezeichnet werden. Cellulase-Gene kommen im Genom der *C. michiganensis*-Unterarten *michiganensis* und *sepedonicus* und im Genom von *L. xyli* subsp. *xyli* vor, wobei sie in *C. michiganensis* plasmidkodiert sind (Monteiro-Vitorello *et al.*, 2004). Die Cellulasen von *Ruminococcus albus* besitzen cellulolytische Eigenschaften, um die Cellulose im Pansen pflanzenfressender Tiere zu verwerten. Dabei wirken die Cellulasen nicht als freie extrazelluläre Enzyme, sondern sind an der bakteriellen Zellwand verankert (Devillard *et al.*, 2004). Genauso wie für Gram-negative Bakterien konnte auch für Gram-positive Bakterien gezeigt werden, dass Proteasen - hier vor allem Serinproteasen - eine Rolle bei der Virulenz des Bakteriums spielen. In *L. xyli* subsp. *xyli* und den *C. michiganensis*-Unterarten *michiganensis* und *sepedonicus* wurde unter anderem gezeigt, dass die Serinprotease Pat-1 wichtig für die Virulenz der Bakterien ist (Dreier *et al.*, 1997; Monteiro-Vitorello *et al.*, 2004).

2.2.3 Methoden zur Charakterisierung und Analyse von Virulenzfaktoren

Die Charakterisierung und Analyse von Virulenzfaktoren wird auf DNA-Ebene mit Hilfe von *in silico*-Analysen oder Mutagenesestudien durchgeführt. Eine Mutation des Zielgens erfolgt dabei durch Insertions-, Deletions- oder Transposonmutagenese. Auf RNA-Ebene können Microarray-Experimente oder RNA-Sequenzierungen durchgeführt werden. Informationen auf Proteinebene werden über Massenspektrometrie, *Yeast-2-Hybrid*-Systeme oder die Aufklärung der Proteinstruktur sowie durch *in silico* Analysen erhalten (Setubal *et al.*, 2005; Watt *et al.*, 2005; Ryan *et al.*, 2011).

2.3 Die Gattung *Clavibacter*

2.3.1 Von der Gattung *Corynebacterium* zur Gattung *Clavibacter*

Die Gattung *Clavibacter* wurde 1984 erstmalig von Davis und Kollegen als Auslöser der *ratoon stunting* Krankheit in der Zuckerrübe und dem Bermudagras beschrieben (Davis *et al.*, 1984). Bei der *ratoon stunting* Krankheit zeigen Pflanzen keine sichtbaren Krankheitssymptome, die Vitalität und das Wachstum sind jedoch stark eingeschränkt (Tiwari *et al.*, 2012). Davor wurden alle Arten der Gattung *Clavibacter* aufgrund der Stäbchenform und der Vervielfältigung durch Schnappteilung zur Gattung *Corynebacterium* gezählt. Die 1984 beschriebenen fünf *Clavibacter*-Arten wurden 1993 in die beiden Gattungen *Clavibacter* und *Rathayibacter* aufgeteilt, vor allem aufgrund der unterschiedlichen Zellwand-

Zusammensetzung und der Resistenz der *Rathayibacter*-Arten gegen Bakteriocine (Zgurskaya *et al.*, 1993). Bakteriocine werden von *Clavibacter*-Unterarten abgegeben, um andere Unterarten oder nah verwandte Arten in ihrem Wachstum zu hemmen (Holtsmark *et al.*, 2006). Im Jahr 2000 wurde *C. xyli* der neuen Gattung *Leifsonia* zugeteilt (Lee *et al.*, 1997; Evtushenko *et al.*, 2000), was dazu führte, dass es nur noch eine *Clavibacter*-Art gab, *C. michiganensis*.

2.3.2 *Clavibacter michiganensis*

C. michiganensis bildet keine Endosporen, ist durch fehlende Flagellen unbeweglich, obligatorisch aerob und nicht säurebeständig. Die Zellwand (Typ B2*γ*) beinhaltet den Zucker Rhamnose, keine Arabinose und die Peptidoglycanschicht enthält Diaminobuttersäure. Mycolsäuren, die in einigen anderen Mitgliedern der Ordnung *Actinomycetales* vertreten sind, fehlen in *C. michiganensis*. Der G+C-Gehalt der DNA liegt zwischen 65 und 75 % und ist somit hoch, wie bei allen pflanzenpathogenen Vertretern der Aktinobakterien (Davis *et al.*, 1984; Francis *et al.*, 2010). Im Vergleich dazu liegt der G+C-Gehalt der DNA bei den Firmicutes zwischen 30 und 40 % (Jung *et al.*, 2010; Madhaiyan *et al.*, 2010). Die fünf Unterarten von *C. michiganensis* haben eine hohe Wirtsspezifität, sodass sie nur in einer der landwirtschaftlich bedeutenden Pflanzen, wie zum Beispiel Weizen oder Mais, Krankheitssymptome auslösen. Sie gelangen über natürlich vorkommende Öffnungen, wie Hydathoden, über Verwundungen im Wurzel- oder Stängelbereich oder über kontaminiertes Saatgut in die Wirtspflanze. Die Bakterien verbreiten sich anschließend über das Xylem, sodass die Infektion systemisch ist und somit die gesamte Pflanze betrifft (Eichenlaub & Gartemann, 2011).

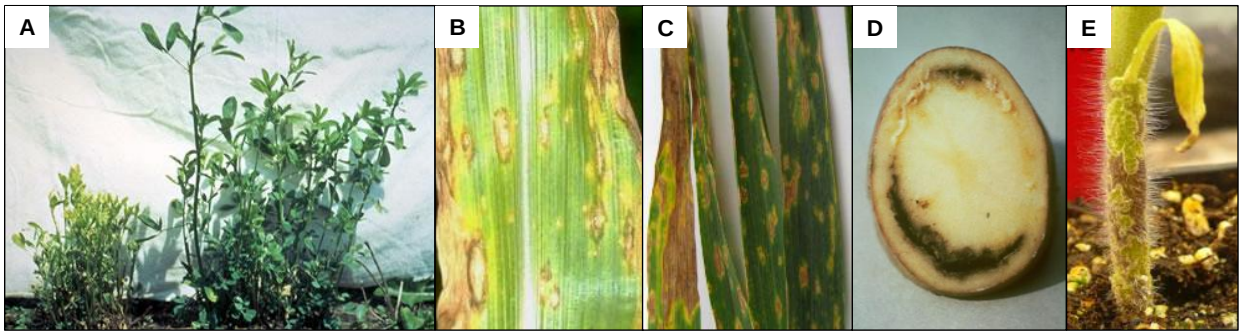


Abbildung 2: Wirtsspezifität der *C. michiganensis*-Unterarten. A: *C. michiganensis* subsp. *insidiosus* verursacht Unterentwicklung in der Luzerne (http://www.eppo.int/QUARANTINE/listA2.htm), **B:** subsp. *nebraskensis* Braunfäule in Mais (http://www.nafis.go.ke/agriculture/maize/disease-control/), **C:** subsp. *tesselarius* Pigmentflecken auf Weizenblättern (http://www.agric.wa.gov.au/PC_93587.html), **D:** subsp. *sepedonicus* Ringfäule in der Kartoffelknolle (http://www.eppo.int/QUARANTINE/listA2.htm) und **E:** subsp. *michiganensis* Welke und Verletzungen des Stängelgewebes in Tomatenpflanzen (diese Arbeit).

Neben der Welke verursacht die Unterart *insidiosus* Unterentwicklung in der Luzerne (*Medicago sativa*) (McCulloch, 1925), *nebraskensis* Braunfäule im Mais (*Zea mays*) (Vidaver, 1974), *tesselarius* Pigmentflecken auf Weizenblättern (*Triticum aestivum*) (Carlson & Vidaver, 1982), *sepedonicus* löst Ringfäule in Kartoffelknollen (*Solanum tuberosum*) aus (Manzer & Genereux, 1981) und die Unterart *michiganensis* verursacht Verletzungen des Stängelgewebes in Tomatenpflanzen (*Solanum lycopersicum*) (Strider, 1969) (Abbildung 2, A-E). Um landwirtschaftliche Schäden und eine großflächige Ausbreitung der Bakterien gering zu halten, werden einige Bakterien von der europäischen Pflanzenschutz-Organisation (*european plant protection organization:* EPPO) als Quarantäneorganismen eingestuft. *C. michiganensis* subsp. *michiganensis,* subsp. *sepedonicus* und subsp. *insidiosus* zählen zu diesen Quarantäneorganismen (http://www.eppo.int/QUARANTINE/listA2.htm), deren Verbreitung meldepflichtig ist und eingedämmt werden muss. Die Genome der Unterarten *michiganensis, sepedonicus* und *nebraskensis* sind vollständig sequenziert und für die Unterarten *michiganensis* und *sepedonicus* auch annotiert (Bentley *et al.*, 2008; Gartemann *et al.*, 2008; Eichenlaub & Gartemann, 2011).

Alle Unterarten, außer *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus*, zeigen aufgrund der Carotinoid-Produktion eine gelb- oder orangefarbene Pigmentierung. Durch die Bildung von Extrapolysacchariden kann die Koloniemorphologie mukoid sein. Die lange Latenzzeit macht die *C. michiganensis*-Unterarten zu landwirtschaftlich bedeutenden Pflanzenpathogenen. Während dieser Latenzzeit kolonisieren die Bakterien die Pflanze, lösen jedoch keine Krankheitssymptome aus. Anschließend kommt es zum plötzlichen Ausbrechen der Infektion (Eichenlaub & Gartemann, 2011).

2.4 *C. michiganensis subsp. michiganensis*

Das Genom des *C. michiganensis* subsp*. michiganensis*-Stammes NCPPB382 wurde 2008 vollständig sequenziert (Gartemann *et al.*, 2008). 33,4 % der annotierten Gene konnte noch keine Funktion zugeordnet werden. Das Genom besteht aus dem Chromosom (3.298 Mb) und den beiden natürlichen Plasmiden pCM1 (27,4 kbp) und pCM2 (70 kbp) (Abbildung 3). Das Chromosom hat einen G+C-Gehalt von 72,6 % und enthält 2.984 für Proteine kodierende Sequenzen, wovon 2.029 eine Funktion zugewiesen werden konnte. pCM1 hat einen G+C-Gehalt von 66,5 % und 28 kodierende Bereiche, von denen nur für sieben die Funktion bekannt ist. pCM2 hat einen G+C-Gehalt von 67,6 %. Von den 68 kodierenden Sequenzen ist nur für 14 die Funktion bekannt. Das Genom von *C. michiganensis* subsp*. michiganensis* enthält 26 Pseudogene, also “nicht-funktionelle Kopien Protein-kodierender Gene” (Chan *et al.*, 2013). Es sind keine Insertionselemente oder Transposons vorhanden, wie sie bei anderen phytopathogenen Bakterien nachgewiesen werden konnten (Gartemann

et al., 2008; Abschnitt 2.2). Die Anzahl der Gene im Genom von *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*, die für Transporter und Regulatoren kodieren, entspricht der von Bodenbakterien, wobei vor allem Gene vorhanden sind, die für putative Carbonsäure- und Zuckertransporter kodieren (Gartemann *et al.*, 2008). Die ausschließlich aerobe Lebensweise schließt Energiegewinnung durch Gärung oder anaerobe Atmung eher aus, weshalb keine Gene für die Sulfat-, Nitrat- und Nitritreduktion vorhanden sind. Die meisten Gene für die Synthese von Aminosäuren sind verfügbar (Gartemann *et al.*, 2008). Für ein Wachstum in Minimalmedium muss dem Medium jedoch neben Nicotinsäure die Aminosäure Methionin zugegeben werden, da keine Gene für die Reduktion von Sulfat zur Verfügung stehen (Gartemann *et al.*, 2008). Das Genom von *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* enthält acht Gene für putative Bakteriocine. Für drei der Genprodukte, darunter Michiganin A, konnte gezeigt werden, dass sie wirkungsvoll das Wachstum des nahen Verwandten *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* inhibieren (Holtsmark *et al.*, 2008; Eichenlaub & Gartemann, 2011).

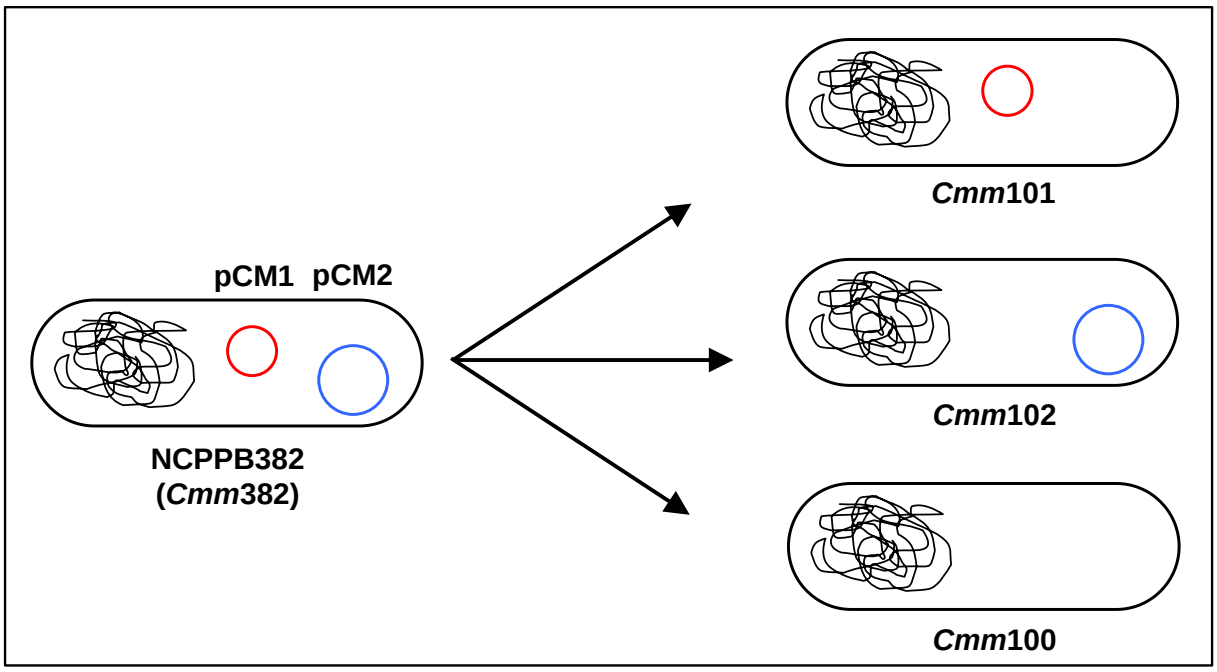


Abbildung 3: Durch Plasmid-Verlust entstehende *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*-Stämme. Durch Erhöhung der Wachstumstemperatur von 25-28°C auf >30°C oder durch eine Elektroporation kann es zum einfachen Verlust (*Cmm*101 und *Cmm*102) oder zum doppelten Verlust (*Cmm*100) der Plasmide kommen. *Cmm*101 und *Cmm*102 verursachen, verglichen mit dem Wildtypstamm *Cmm*382, geringere Krankheitssymptome in der Wirtspflanze. *Cmm*100 kann die Pflanze nur noch kolonisieren, löst jedoch keine Krankheitssymptome mehr aus.

Die Wachstumstemperatur für *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* liegt zwischen 25°C und 28°C. Durch Stressbedingungen, wie zum Beispiel eine erhöhte Wachstumstemperatur oder das Einbringen von Fremd-DNA mittels Elektroporation, kann es zum Verlust von pCM1

und/oder pCM2 kommen. Daraus resultieren die Stämme *Cmm*101 und *Cmm*102, die entweder pCM1 oder pCM2 besitzen oder der plasmidfreie Stamm *Cmm*100 (Abbildung 3). *Cmm*100 kann das Xylem kolonisieren, löst jedoch keine Krankheitssymptome aus, *Cmm*101 und *Cmm*102 verursachen geringere Krankheitssymptome als der Wildtypstamm *Cmm*382 (Meletzus *et al.*, 1993; Gartemann *et al.*, 2003).

Die Gene auf dem Chromosom sind offensichtlich entscheidend für die Kolonisierung des Wirts, die Gene auf den Plasmiden sind in der Virulenzausbildung des Bakteriums involviert (Meletzus *et al.*, 1993). Dabei ist jedoch ebenfalls das Zusammenspiel von Genen auf dem Chromosom und den Plasmiden wichtig (Eichenlaub & Gartemann, 2011). Auf dem Chromosom liegen 20 Regionen mit einem niedrigeren G+C-Gehalt, die zum Teil Virulenzgene enthalten (Gartemann *et al.*, 2008). 46 Gene sind als „extrazelluläre Proteine" annotiert (Flügel *et al.*, 2012), von denen die meisten für putative Serinproteasen kodieren. Sekretionssysteme, wie sie in Gram-negativen Bakterien vorkommen, gibt es in Gram-positiven Bakterien nicht. Transportproteine könnten jedoch eine ähnliche Funktion übernehmen. Dafür spricht, dass im Genom von *C. michiganensis* subsp*. michiganensis* Gene vorhanden sind, deren Genprodukte an der Erkennung von Signalsequenzen extrazellulärer Proteine beteiligt sein könnten (Gartemann *et al.*, 2008).

2.4.1 Infektion von Tomatenpflanzen

C. michiganensis subsp*. michiganensis* gelangt über Wunden in den Wurzeln oder im Stängel oder über natürliche Öffnungen wie Hydathoden in seine landwirtschaftlich bedeutendste Wirtspflanze *S. lycopersicum* (Tomate), einem Vertreter der Solanaceae (Strider, 1969; Carlton *et al.*, 1998). Nach dem Eindringen über Hydathoden siedeln sich die Bakterien zuerst im dahinter liegenden intrazellulären Raum an und sind erst sieben Tage nach dem Eindringen in den Xylemgefäßen detektierbar (Carlton *et al.*, 1998). Sie verbreiten sich daraufhin über die Xylemgefäße in der gesamten Pflanze, sodass die Infektion systemisch ist. Dabei kann eine Dichte von 10^9 Bakterien pro g Pflanzenmaterial erreicht werden (Meletzus *et al.*, 1993). In den Xylemgefäßen werden Wasser und gelöste Nährstoffe akropetal von der Wurzel in die gesamte Pflanze transportiert (Abbildung 4, A). Im Gegensatz dazu wird das zuckerreiche Phloemexudat in den Phloemgefäßen zur Zuckerspeicherung basipetal in die Wurzeln transportiert. Chalupowicz und Kollegen konnten mittels GFP-markierter *C. michiganensis* subsp*. michiganensis*-Stämme zeigen, dass sich diese an spiralförmige, sekundäre Zellwandverdickungen des Protoxylems anhefteten (Chalupowicz *et al.,* 2012; Abbildung 4, B).

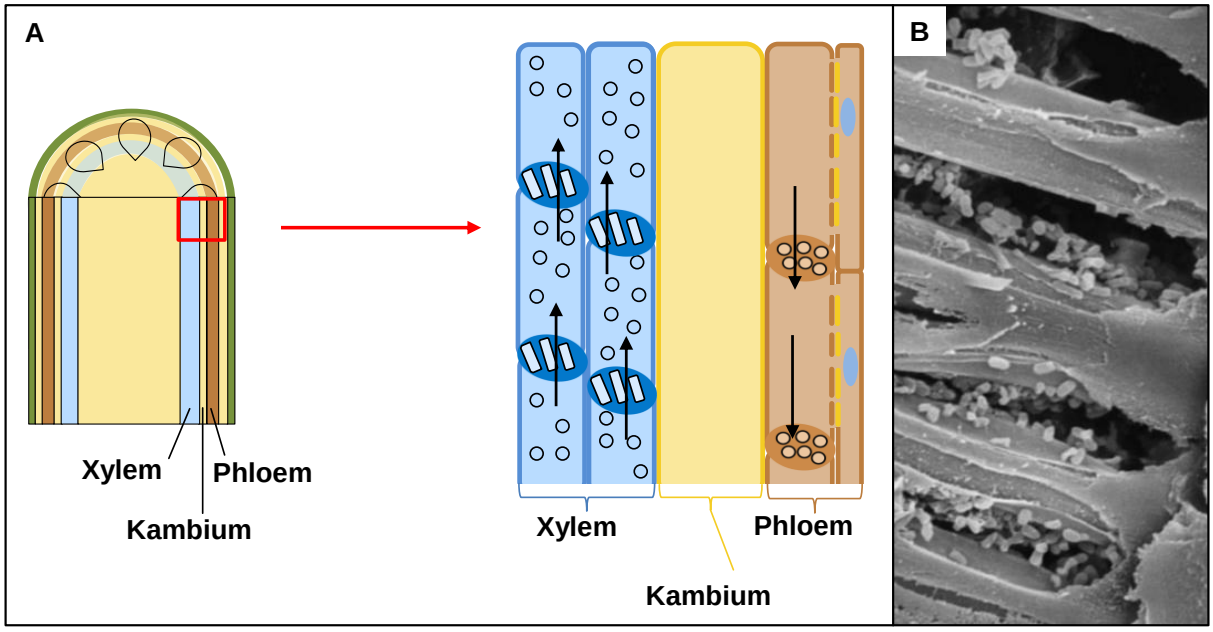


Abbildung 4: Aufbau der Leitgewebe in Tomatenpflanzen und deren Besiedelung durch *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*. A: Wasser und gelöste Nährstoffe werden in den Xylemgefäßen akropetal von den Wurzeln in die gesamte Pflanze transportiert. Zucker werden im Phloemexudat basipetal transportiert (modifiziert, nach http://mrb-science.wikispaces.com/Roots+and+Stems). **B:** Längsschnitt eines spiralen Xylemgefäßes, nach der Infektion mit *C. michiganensis* subsp. *michiganensis.* Rasterelektronenmikroskop-Bild (Jahr *et al.*, 1999).

Im späteren Verlauf der Infektion werden pflanzliche Zellen zerstört, sodass die Lokalisation der Bakterien nicht mehr ausschließlich auf das nährstoffarme Xylem beschränkt ist und somit die Nährstoffverfügbarkeit zunimmt (Wallis, 1977). Erste Krankheitssymptome nach einer Infektion mit *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* sind eine einseitige Blattwelke und leichte Läsionen des Stängels (Abbildung 5, A und B). Im weiteren Verlauf der Infektion zeigen fast alle Blätter der Pflanze Welkesymptome (Abbildung 5, C) und die Läsionen des Stängels werden großflächiger und brechen auf (Abbildung 5, E).

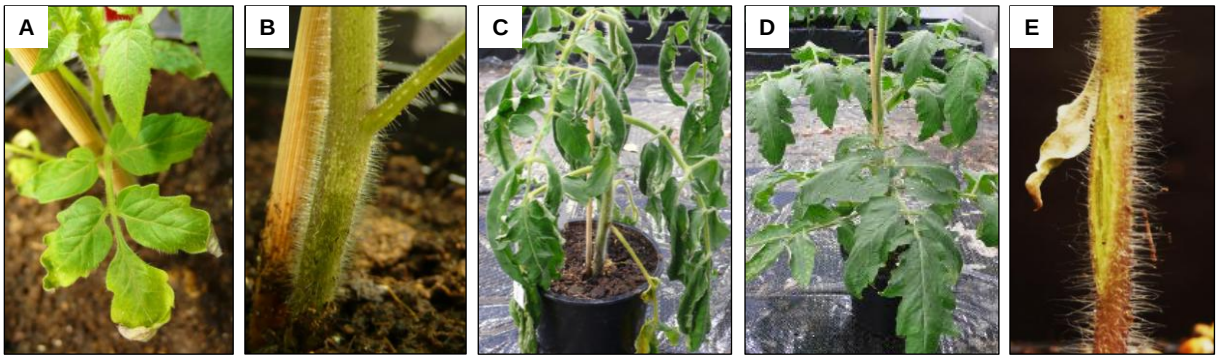


Abbildung 5: Krankheitssymptome von *Cmm*382-infizierten Tomatenpflanzen. Frühzeitige Symptome nach einer Infektion mit *Cmm*382 sind die einseitige Blattwelke (**A**) und leichte Stängelläsionen (**B**). Im späteren Stadium der Infektion kommt es zu einer kompletten Blattwelke (**C**). Dazu im Vergleich eine gesunde Pflanze ohne Welkesymptome (**D**). Neben der Welke kommt es zu großflächigen Verletzungen des Stängelgewebes (**E**).

Erfolgt die Infektion in einem frühen Stadium des Pflanzenwachstums, so ist die Infektion meist letal für die Pflanze. Wird die Pflanze in einem späten Wachstumsstadium infiziert oder die Krankheitssymptome treten aufgrund der Latenzzeit erst spät auf, kann die Pflanze überleben. Die entstehenden Früchte können schwarze Flecke bilden, sogenannte *birds eyes* (Gartemann *et al.*, 2003). *C. michiganensis* subsp*. michiganensis* kann über eine Infektion der Tomatenfrüchte in die Samen gelangen, sodass auch die nächste Generation infiziert ist. Auch in dieser kann das Bakterium so lange latent leben, bis die Bedingungen optimal sind und es zur Auslösung von Krankheitssymptomen kommt (Tsiantos, 1987). Eine Sameninfektion kann ebenfalls über eine Kontamination des Saatguts stattfinden (Hogenhout & Loria, 2008). Von der Samenoberfläche gelangt *C. michiganensis* subsp*. michiganensis* in die Pflanze und besiedelt dort zu Beginn vor allem die ersten sichtbaren Blätter (Cotyledonen) und den Stängel (Hypocotyl) der keimenden Pflanze (Xu *et al.*, 2010). Dabei ist nicht bekannt, wie das Bakterium in die Pflanze gelangt. Auf kontaminiertem, oberirdischem Material können die Bakterien 24 Monate überleben, unterirdisch nur sieben Monate (Gleason *et al.*, 1991). Eine schnelle Zerstörung der Bakterien über Kompostierung oder Pasteurisierung ist nicht möglich (Francis *et al.*, 2010). Ausbreitung und Wachstum der Bakterien können jedoch durch chemische Anwendungen mit Kupferverbindungen (Hausbeck *et al.*, 2000) oder durch die Verwendung des Antibiotikums Fragarin aus Erdbeerblättern eingedämmt werden (Filippone *et al.*, 2001). Außerdem zeigte ein *Streptomyces*-Stamm eine antimikrobielle Aktivität gegenüber *C. michiganensis* subsp*. michiganensis* (Yuan *et al.*, 2009). Resistente Tomatenpflanzen wurden bis heute nicht identifiziert. Der sogenannte *quantitative trait locus* (QTL) auf dem Genom wilder Tomatenpflanzen trägt jedoch zur Resistenz der Pflanze bei (Kabelka *et al.*, 2002). Außerdem wurden zwei pflanzliche Proteine identifiziert, die bei einer Überexpression antimikrobielle Aktivität zeigten (Balaji & Smart, 2012). War die mRNA-Konzentration von Snakin-2 oder dem Extensin-ähnlichen Protein ELP in der Pflanze hoch, traten die Krankheitssymptome in infizierten Pflanzen in abgeschwächter Form auf (Balaji & Smart, 2012).

Neben der Tomatenpflanze als suszeptibler Wirtspflanze löst *C. michiganensis* subsp*. michiganensis* auch in Paprikapflanzen und anderen Vertretern der Familie Solanaceae typische Krankheitssymptome aus. Die landwirtschaftlich wichtigste Pflanze ist jedoch die Tomatenpflanze (Gleason *et al.*, 1993). Für Tabakpflanzen (*Nicotiana*) und die Wunderblume (*Mirabilis jalapa*) wurde eine Resistenz gegenüber dem Bakterium nachgewiesen (Gitaitis, 1990; Alarcón *et al.*, 1998). Nach der bakteriellen Infektion kommt es zu Abwehrreaktionen wie einem lokalen pflanzlichen Zelltod, der im Zuge einer HR ausgelöst wird. In der Wunderblume wurde ein lokaler Zelltod ebenfalls ausgelöst, wenn ausschließlich der Medienüberstand einer Bakterienkultur verwendet wurde. Daraus lässt sich schließen, dass an der Auslösung der Reaktion extrazelluläre bakterielle Proteine beteiligt sind (Alarcón *et al.*,

1998). Somit zählen spezifische extrazelluläre Proteine von *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* zu den bakteriellen PAMPs, die von pflanzlichen Rezeptoren erkannt werden und Abwehrreaktionen auslösen (siehe Abschnitt 2.1). Weitere mögliche PAMPs könnten extrazelluläre Polysaccharide (EPS), andere Zellwandkomponenten, wie Peptidoglycan, Lipoteichonsäuren sowie Lipopeptide sein, aber auch hydrolytische Enzyme oder deren Produkte aus der pflanzlichen Zellwand (Balaji & Sessa, 2008). Als Reaktion auf die bakterielle Infektion kommt es zu einer basalen Pflanzenantwort, bei der unter anderem PR- und Rezeptorgene hochreguliert, freie Sauerstoffspezies produziert werden und die Hormonbiosynthese, zum Beispiel von Ethylen, erhöht wird (Balaji *et al.*, 2008; Balaji & Sessa, 2008).

2.4.2 Virulenzfaktoren in *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*

In *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* sind erst wenige Virulenzfaktoren charakterisiert. Zum einen sind das die Serinproteasen Pat-1 (Dreier *et al.*, 1997), ChpC und ChpG (Stork *et al.*, 2008) sowie PpaA und PpaC (Eichenlaub & Gartemann, 2011), zum anderen ist das die Endo-*β*-1,4-Glucanase CelA (Jahr *et al.*, 2000).

Das Genom von *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* enthält 46 Gene, die für mögliche Serinproteasen kodieren, wovon 21 extrazellulär aktiv und acht putative Pseudogene sind (Flügel *et al.*, 2012). Die extrazellulären Serinproteasen werden der Chp (S1A)-, der chymotrypsin-verwandten Ppa- und der Subtilase-Familie zugeordnet (Gartemann *et al.*, 2008). Serinproteasen können, wie es auch für Cysteinproteasen in Proteobakterien bekannt ist, in pflanzliche Signalwege eingreifen und somit als Effektoren im Zytoplasma wirken (Abramovitch *et al.*, 2006; Hogenhout & Loria, 2008). Neben *pat-1* sind auf den natürlichen Plasmiden pCM1 und pCM2 drei weitere Serinproteasegene, *phpA*, *phpB* und *ppaJ*, lokalisiert. Die Pat-1-Homologen PhpA und PhpB haben jedoch vermutlich keinen großen Einfluss auf die Virulenz des Bakteriums (Burger *et al.*, 2005). Alle weiteren 17 Serinproteasegene sind auf dem Chromosom lokalisiert, wobei 14 Gene in der 100 kbp umfassenden *chp*-Unterregion der *chp*/*tomA*-Region nahe des *origins* liegen (Gartemann *et al.*, 2008). Die 129 kpb umfassende *chp*/*tomA*-Region hat einen niedrigeren G+C-Gehalt als der Rest des Genoms und enthält unter anderem Gene, deren Genprodukte am Zuckermetabolismus beteiligt sind (Gartemann *et al.*, 2008). Die Gene der *chp*/*tomA*-Region sind unter anderem wichtig für die Ausbreitung des Bakteriums im Xylemsaft (Chalupowicz *et al.*, 2012). Neben den Genen für Serinproteasen beinhaltet die *chp*/*tomA*-Region das Gen *tomA*, das für eine Tomatinase kodiert (Kaup *et al.*, 2005). Tomatinasen zerstören das pflanzliche Alkaloid *α*-Tomatin, welches das bakterielle Wachstum hemmt. Eine Tomatinase-Aktivität konnte für TomA in *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* gezeigt werden, in der

Virulenz des Bakteriums spielt TomA jedoch wahrscheinlich keine große Rolle (Kaup *et al.*, 2005). Eine Mutation der gesamten *chp*/*tomA*-Region führte, verglichen mit dem Wildtyp, zu einer geringeren Kolonisierungsdichte in der Pflanze und zu einer reduzierten Virulenz (Chalupowicz *et al.*, 2010). Cellulasen tragen als hydrolytische Enzyme ebenfalls zur Virulenz des Bakteriums bei. Neben *celA* existiert im Genom von *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* ein weiteres Gen für eine Cellulase, *celB*, welches jedoch ein putatives Pseudogen ist (Gartemann *et al.*, 2008). Neben den Cellulasegenen sind zusätzliche Gene vorhanden, die für hydrolytische Enzyme kodieren. Dazu gehören Endoglucanasen (CMM_2691 und CMM_2692), eine Xyloseisomerase (*xylA*), Pektat-Lyasen (*pelA1* und *pelA2*), Xylanasen (*xysA* und *xysB*), eine Polygalacturonase (*pgaA*), Perforin (CMM_2382), eine Phospholipase C (CMM_0504) und 16 Glycosylhydrolasen (http://cmr.jcvi.org; Gartemann *et al.*, 2008; Savidor *et al.*, 2012). Ein Signalpeptid für den Export oder eine Transmembrandomäne ist in den meisten Fällen vorhanden (Tabelle 1). Die Phospholipase C spielt zum Beispiel bei der Pathogenität des Pilzes *Magnaporthe oryzae* in Reispflanzen eine Rolle (Rho *et al.*, 2009). Extrazelluläre Enzyme attackieren die pflanzliche Zellwand, um die Nährstoffversorgung des Bakteriums zu erhöhen. Werden die Wände von Xylemgefäße attackiert, kann dies zu einem Wasserstau führen und somit eine Blattwelke hervorrufen (Wallis, 1977; Jahr *et al.*, 1999). Ob extrazelluläre Polysaccharide (EPS) in der Virulenz des Bakteriums, zum Beispiel in der Verursachung eines Wasserstaus, involviert sind, bleibt unklar. Mutanten, die nur 10 % der normalen EPS besaßen, zeigten keine Veränderung in der Ausbildung von Krankheitssymptomen (Bermphol *et al.*, 1996; Jahr *et al.*, 1999). EPS sind aber dennoch wichtig für das Bakterium, da sie einen Schutz vor Austrocknung bieten, Nährstoffe und Mineralien wegen der enthaltenen Säure akkumulieren, toxische Verbindungen unschädlich machen und eine Erkennung durch die Pflanze erschweren (Király *et al.*, 1997; Jahr *et al.*, 1999).

2.4.3 Molekularbiologische Methoden

Die Charakterisierung und Analyse von Virulenzfaktoren für *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* ist aufgrund mangelnder molekularer und biochemischer Methoden bis heute nicht weit fortgeschritten. Eine Charakterisierung von Virulenzfaktoren wurde auf mehrere Arten durchgeführt, zum Beispiel durch *in silico*-Analysen (Gartemann *et al.*, 2008; Stork *et al.*, 2008), Klonierungs- und Pflanzentests (Meletzus *et al.*, 1993), Transposonmutagenese- (Kirchner *et al.*, 2001; Kaup *et al.*, 2005), DNA-Hybridisierungs- (Burger *et al.*, 2005) und Microarray-Studien (Flügel *et al.*, 2012) sowie mit Hilfe von Massenspektrometrie-Analysen des Mediumüberstandes einer Bakterienkultur (Holtsmark *et al.*, 2006) und des Xylemsaftes infizierter Pflanzen (Savidor *et al.*, 2012). Die Analyse annotierter putativer Virulenzfaktoren

erfolgte durch Mutagenesestudien. Dabei wurden die Zielgene entweder im Wildtypstamm deletiert (Chalupowicz *et al.*, 2010) oder über einen Vektor in den Stamm *Cmm*100 eingebracht (Meletzus *et al.*, 1993; Dreier *et al.*, 1997; Jahr *et al.*, 2000). Wenn das Zielprotein ein Virulenzfaktor ist, löst der transformierte *Cmm*100-Stamm in infizierten Pflanzen Krankheitssymptome aus. Eine weitere Analyse von Virulenzfaktoren erfolgte für *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* durch Insertionsmutagenese. Bei der Transformation des Wildtypstammes mit dem Insertionsplasmid kam es dabei meistens zu dem Verlust des natürlichen Plasmids pCM2 (Jahr *et al.*, 2000; Stork *et al.*, 2008). Nachfolgende Analysen konnten demnach nicht im Wildtypstamm, sondern nur im Stamm *Cmm*101 durchgeführt werden. Allgemein wird durch die Mutation eines einzelnen Gens die Virulenz von *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* vermutlich nicht oder nur teilweise eingeschränkt, da die Pathogenität des Bakteriums auf einem Zusammenspiel von Virulenzfaktoren basieren könnte (Walton, 1994; Tews, 2012). Weitere Analysen von Virulenzfaktoren erfolgten mit Hilfe von qPCR (Chalupowicz *et al.*, 2010) und Microarray-Experimenten (Flügel *et al.*, 2012). Die Analysen wurden unter anderem dadurch ermöglicht, dass zum einen der *E. coli* / *Clavibacter Shuttle* Vektor pDM302 zur Verfügung stand (Meletzus & Eichenlaub, 1991; Meletzus *et al.*, 1993), zum anderen ein angepasstes Protokoll für die Elektroporation (Kirchner *et al.*, 2001). Der Nachteil des Vektors pDM302 ist, dass er nicht kompatibel ist mit dem natürlichen Plasmid pCM1. Durch die Selektion mit einem auf pDM302 abgestimmten Antibiotikum geht pCM1 verloren, sodass nachfolgende Analysen nur im Stamm *Cmm*102 möglich sind. Hindernisse bei der Arbeit mit *C. michiganensis* subsp*. michiganensis* sind der schnelle Verlust der natürlichen Plasmide durch Stressbedingungen wie zu hohe Temperatur oder eine Elektroporation sowie die geringe Verfügbarkeit von Promotorsequenzen. Ein Vergleich der bekannten Promotorsequenzen für *pat-1* und *celA* mit bekannten Promotorsequenzen anderer Gram-positiver Bakterien lieferte keine homologen Sequenzen (Dreier *et al.*, 1997; Jahr *et al.*, 2000). Die Definition einer spezifischen Konsensussequenz für Promotorstrukturen wie die -10-, die -35-Region und die Shine-Dalgarno-Sequenz erfordert die Analyse weiterer Promotorregionen.

2.5 Zielsetzung der Arbeit

Für ein besseres Verständnis der Wirt-Pathogen-Interaktion zwischen dem Gram-positiven Bakterium *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* und seiner Wirts-Pflanze *S. lycopersicum* (Tomate), in der eine bakterielle Besiedelung der Xylemgefäße stattfindet, zur Eindämmung der Infektion ist die Identifizierung und Charakterisierung von Virulenzfaktoren wichtig.

Eine *in planta*-Analyse der Infektion ist technisch schwierig. Nach der Analyse der bakteriellen Infektion der Wirts-Pflanze und der Nicht-Wirts-Pflanze *N. tabacum* (Tabak) war

deshalb die Etablierung eines synthetischen Xylemsaft-imitierenden Mediums das Hauptziel dieser Arbeit. In diesem sollte die Genexpression auf Transkriptom- und Proteomebene mit der Expression in Minimalmedium verglichen werden, um medienbedingte Unterschiede feststellen zu können.

Für *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* wurden bis jetzt kaum Regulator- und Promotorstudien durchgeführt (Dreier *et al.*, 1997; Jahr *et al.*, 2000). Aus diesem Grund waren zwei weitere Ziele dieser Arbeit die Identifizierung von Regulatoren für die beiden am besten charakterisierten Virulenzgene *pat-1* und *celA* sowie die Charakterisierung von *Clavibacter*-typischen Konsensussequenzen in Promotorstrukturen wie der -10-, der -35-Region und der Shine-Dalgarno-Sequenz (Shine & Dalgarno, 1974).

3 Material und Methoden

3.1 Bakterienstämme, Plasmide und Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme sind in Tabelle 2 aufgelistet. In Tabelle 3 sind die verwendeten Plasmide wiedergegeben, in Tabelle 4 die Oligonukleotide. Sie wurden von Eurofins MWG Operon (Ebersberg) bezogen und in H_2O_{bidest} auf eine Konzentration von 100 pmol/µl eingestellt.

Tabelle 2: Bakterienstämme

Stamm	Genotyp, Phänotyp	Referenz
Escherichia coli		
DH5αMCR	*endA1, supE44, thi-1, λ⁻, recA1, gyrA96, relA1, deoR, Δ(lacZYA-argF), U169, ¢80Δ lacZ, ΔM15mcrA, Δ(mmr hsdRMS mcrBC)*	(Grant *et al.*, 1990)
C. michiganensis* subsp. *michiganensis		
NCPPB382 (*Cmm*382)	Wildtyp, pCM1, pCM2; virulent	(Gartemann *et al.*, 2008)
*Cmm*100	*Cmm*382 ohne pCM1 und pCM2, nicht-virulent	(Meletzus & Eichenlaub, 1991)
*Cmm*102pDM302	*Cmm*382-Derivat, pDM302, pCM2	diese Arbeit
*Cmm*102pDM302P*pat-1gfp*	*Cmm*382-Derivat, pDM302P*pat-1gfp*, pCM2	diese Arbeit
*Cmm*102pDM302P*glnA1gfp*	*Cmm*382-Derivat, pDM302P*glnA1gfp*, pCM2	diese Arbeit
*Cmm*102pDM302P*pfkAgfp*	*Cmm*382-Derivat, pDM302P*pfkAgfp*, pCM2	diese Arbeit
EH2408 (*Cmm*382::pUC18'fCMM_2408*cat*")	*Cmm*382, pUC18'fCMM_2408*cat*", chromosomal integriert	diese Arbeit
EH2766 (*Cmm*382::pUC18'fCMM_2766*cat*")	*Cmm*382, pUC18'fCMM_2766*cat*", chromosomal integriert	diese Arbeit

Tabelle 3: Plasmide

Plasmide	Eigenschaften	Referenz
pDM302	*nptII*, *cat*, pCM1-Derivat	(Meletzus *et al.*, 1993)
pEPR1P45*gfp*	*gfp*uv, *nptII*, *rep*, *per*, *T1* (T-*trpE*) (T-*trpA*), *T2* (T-*rrnB*) (T-*leuB*)	(Knoppová *et al.*, 2007)
pDM302*gfp*	pDM302, *gfp*uv aus pEPR1P45*gfp*	diese Arbeit
pDM302P*pat-1gfp*	pDM302*gfp* mit einer 200 bp *upstream*-Region von *pat-1*	diese Arbeit

Plasmide	Eigenschaften	Referenz
pDM302P*glnA1gfp*	pDM302*gfp* mit einer 200 bp *upstream*-Region von *glnA1*	diese Arbeit
pDM302P*pfkAgfp*	pDM302*gfp* mit einer 200 bp *upstream*-Region von *pfkA*	diese Arbeit
pUC18	*bla, lacZα*, *rep* (pMB1)	(Yanisch-Perron *et al.*, 1985)
pDrive*cat*	*bla, nptII, cat, lacZ'*, P*lac*, f1 origin, T7-Promotor	diese Arbeit
pUC18*cat*	pUC18, *cat* aus pDrive*cat*	diese Arbeit
pUC18fCMM_2408*cat*	pUC18*cat*, 480 bp aus CMM_2408	diese Arbeit
pUC18fCMM_2766*cat*	pUC18*cat*, 430 bp aus CMM_2766	diese Arbeit
pUC18fpCM2_0056*cat*	pUC18*cat*, 630 bp aus pCM2_0056	diese Arbeit
pUC18*nptII*	pUC18, *nptII* aus pDM302	diese Arbeit

Tabelle 4: Oligonukleotide: Restriktionsschnittstellen unterstrichen

Name (T_A [°C])	Sequenz
pat-1-fw (54)	AACCAAAGTCCCGGCTGATC
pat-1-rev (54)	TCAGGAGGTCGCTAATATGT
celA-fw (58)	TCCACAACGAACCGCACGGT
celA-rev (58)	GTCCCAAATACCCGGCAAGT
gfp-EcoRI-fw (57)	CGGAATTCATGATTGAACAAGAGGTA
gfp-HindIII-rev (57)	CCAAGCTTTTATTTGTAGAGCTCATCC
*pat1*_prom-ScaI-fw (60)	AGAGTACTAGATCTCGGTTCGTTCGTAGGAG
*pat1*_prom-EcoRI-rev (60)	AAGAATTCAGTAGCGCCCGGAACAGG
pDM302-seq-fw	CTGGCCGTGGTGACAAGAAGAA
pDM302-seq-fw1	TCAGACAGGTCAGGGGTTGTCG
prom-1636-fw (ScaI) (*glnA1*) (57)	GGAGTACTTTCGTGGGAGTCGCG
prom-1636-rev (EcoRI) (*glnA1*) (57)	TCGAATTCGTCTCTGAACATGTGGTG
qac-fw	GCAAACCGCCTCTCCCCGC
ALPHA II-seq-fw	TGTGCTGCAAGGCGATTAAG
18 S-fw (1:3) (60)	CCCGTTGCTGCGATGATTC
18 S-rev (1:3) (60)	ATTCTCCGTCACCCGTCAC
HSR203J-fw (1:3) (60)	GGCTCAACGATTACGCAGAT
HSR203J-rev (1:3) (60)	CGGGGTTTGCTCTTGTTCTA
pfkA-ScaI-fw (57)	CGAGTACTCGCGCGAGG
pfkA-EcoRI-rev (57)	TCGAATTCGCACACGTCC

Name (T_A [°C])	**Sequenz**
glnA-SP1-rev (55)	GGGGGTTGTAGATGTCGAA
glnA-SP2-rev (65)	CGACGGTGGATGCGGGGATGTTGA
*cmx*_KpnI_fw (64)	CCGGTACCACTGCAGGACATGGTCAAAG
*cmx*_SexAI_rev (64)	AACCTGGTTCGGATGGGTCATCAATTGG
*tomA*_RNA_c_fw (55)	GCGCCACCGACGTCGAG
*tomA*_RNA_c_rev (55)	GCGGATGTCAGTGTTCTCAT
*gyrA*_RNA_c_fw (53)	ATGAGTAGTGTCGCCGAG
*gyrA*_RNA_c_rev (53)	CCACGGAGAAGAGGAACG
*cmx*_SphI_rev (64)	GCATGCTCGGATGGGTCATCAATTGG
BM*celA*-s (5'-BIO) (45)	CGATGCCGTCGAGCTT
BM*pat-1*-s (5'-BIO) (45)	ATGAGGCGGGCCCAC
BM*celA*-as (45)	AGGACGAGCCGAAGCA
BM*pat-1*-as (45)	TATGCGCGACATGAACTG
ALPHA_I_seq_rev	CTTCCGGCTCGTATGTTGTG
pDM302_rev	GCTTCCTTTAGCAGCCCTTG
pDM302_fw	GCCTTGAAGGCATGTTAGAG
pDM302_seq_rev2	TTGTCCAGATAGCCCAGTAG
2408_XbaI_fw (70,3)	GGCCTCTAGAACGATGGCGGCGAGCGGCTG
2408_XbaI_rev (70,3)	GGCCTCTAGATAGCCCACGCTCACCGCAAC
2766_XbaI_fw (62)	GGCCTCTAGACTACGAGGGCTGGCAGATCC
2766_XbaI_rev (62)	GGCCTCTAGACGCATGAGGTAGCGCAGCAG
0056_XbaI_fw (62)	GGCCTCTAGAACGGCAGAGGAACGCATCAC
0056_XbaI_rev (62)	GGCCTCTAGAACCGACTCGCTGACGATCTC
CMM_2408probefw (68)	CGCCGCTCGCTCTCCACCTG
CMM_2408proberev (68)	TCGAGCGCGGGTAGCCGGAC
CMM_2766probefw (66)	GCGCCCTGCTCGTGTGGGTG
CMM_2766proberev (66)	CGACGACGAGCACCCGGATG
pCM20056probefw (62)	GGTCGAAGCCGAACAGGAAG
pCM20056proberev (62)	GGTACACGCCGTGTGCCATC
*pat-1*_sonde_fw (58)	ATCTTCAGCGACAGTCAAGG
*pat-1*_sonde_rev (58)	GGGCCCTAATACGACTCACTATAGGGCGCTACGACTTGG TGACTTC
*celA*_sonde_fw (62,5)	GCGCCGATCTTGCACCCGTC

Name (T_A [°C])	Sequenz
*celA*_sonde_rev (62,5)	GGGCCCTAATACGACTCACTATAGGGTGCAGGGACAGCCGGCATGGAGC
CMM_2408_sonde_fw (61)	GGATCGAGATGCTGCAGGAC
CMM_2408_sonde_rev (61)	GGGCCCTAATACGACTCACTATAGGGCGGCATGGAGCAGCTGATCG
CMM_2766_sonde_fw (61)	TCACCGACCTGCTCCAGATG
CMM_2766_sonde_rev (61)	GGGCCCTAATACGACTCACTATAGGGCACACCCGGTCGAGGATCTG
pCM2_0056_KpnI_fw (64)	GGCCGGTACCTCCCGCCTGCAGCTGTCACG
pCM2_0056_KpnI_rev (64)	GGCCGGTACCGGATGCCGCGGATCTCGTTG
*npt*_AccI_fw (57)	GGCCGTCGACCGATGGGAACCACGGAGAAG
*npt*_XbaI_rev (57)	CCGGTCTAGAGCTCAGAAGAACTCGTCAAG
gapA-sonde-fw (64)	GCCGCTTCACGAAGGCGGAG
gapA-sonde-rev (64)	GGGCCCTAATACGACTCACTATAGGGGCGTTCGCCGAGGTCTCGATG

3.2 Nährmedien, Kultivierungs- und Infektionsbedingungen

3.2.1 Nährmedien für *E. coli* und *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*

Alle *E. coli*-Stämme wurden standardmäßig in LB-Medium kultiviert, alle *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*-Stämme in TBY-Medium. Für Letztere wurden außerdem folgende weitere Medien verwendet: SB-Medium (Engemann, 2006), Minimalmedium M9 (Engemann, 2006), XVM2 (Wengelnik *et al.*, 1996) und Xylemsaft imitierendes Medium (XMM). Die Zusammensetzung der Medien ist in Tabelle 5 aufgelistet, die benötigten Antibiotika-Konzentrationen sind in Tabelle 6 aufgeführt. Zur Herstellung von LB- und TBY-Agarplatten wurden dem Medium 15 g/l Bacto-Agar zugesetzt. Für die Anfertigung von Agarplatten mit einem Antibiotikum wurde dieses nach dem Autoklavieren und Abkühlen des Mediums in entsprechender Menge zugegeben (Tabelle 6). Für die Antibiotika wurden Stammlösungen in 1.000-fach höherer Konzentration in H_2O_{bidest} bzw. 70%igem (v/v) Ethanol, hergestellt. Die Stammlösungen wurden sterilfiltriert (*Minisart Filter*, Porengröße 20 µm, Sartorius AG, Göttingen) und bis zum Gebrauch bei -20°C bzw. 4°C gelagert.

Tabelle 5: Zusammensetzung der verwendeten Nährmedien

Medium	Zusammensetzung pro l
LB	10 g NaCl, 10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt; Sterilisation durch Autoklavieren (20 min, 121°C)
TBY	10 g NaCl, 5 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, pH 7,5; Sterilisation durch Autoklavieren
SB	Lösung 1: 5 g NaCl, 10 g Trypton, 4 g Hefeextrakt, pH 7,5, 700 ml; Sterilisation durch Autoklavieren Lösung 2: 91,1 g Sorbitol, 20 ml 1 M $MgCl_2$, 200 ml 0,1 M $CaCl_2$, 300 ml; Sterilisation durch Filtration (20 µm) Lösung 1 und 2 mischen; Lagerung bei 4°C
M9	Lösung 1: 1 g Glucose in 200 ml H_2O_{bidest}; Sterilisation durch Autoklavieren Lösung 2: 15 g Na_2HPO_4 x 12 H_2O, 3 g KH_2PO_4, 0,5 g NaCl, 1 g NH_4Cl, 298,4 mg Methionin (2 mM), pH 7,4; Sterilisation durch Autoklavieren Lösung 1 und 2 mischen, Zusatz von: 100 µl 10 x Spurenelementen, 2,5 µl Thiamin (200 mg/ml), 27,6 µl Nicotinsäure (18 mg/ml), 1 ml 0,1 M $CaCl_2$, 2 ml 1 M $MgSO_4$ **10 x Spurenelemente** (100ml): 200 mg $FeCl_3$ x 6 H_2O, 10 mg $CuCl_2$ x 2 H_2O, 10 mg $Na_2B_4O_7$ x 10 H_2O, 10 mg $MnCl_2$ x 2 H_2O, 10 mg $(NH_4)_6Mo_7$ x 4 H_2O, 40 mg $ZnCl_2$, pH (HCl) 1; Sterilisation durch Filtration
XVM2	1,168 g NaCl, 1,32 g $(NH_4)_2SO_4$, 1,233 g $MgSO_4$, 0,147 g $CaCl_2$, 0,022 g KH_2PO_4, 0,056 g K_2HPO_4, pH 6,7; Sterilisation durch Autoklavieren + 0,01 mM $FeSO_4$, je 10 mM Fruktose und Saccharose, 0,03 % (w/v) *casamino acids*
XMM	1,168 g NaCl, 2,02 g KNO_3,1,233 g $MgSO_4$, 0,147 g $CaCl_2$, 0,022 g KH_2PO_4, 0,056 g K_2HPO_4, pH 6,7; Sterilisation durch Autoklavieren + 0,01 mM $FeSO_4$, 0,2 % (w/v) *casamino acids*

Tabelle 6: Antibiotika-Konzentrationen für LB- und TBY-Medium

Antibiotikum	Endkonzentration für *E. coli*	Endkonzentration für *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*
Ampicillin	100 µg/ml	---
Chloramphenicol	25 µg/ml	10 µg/ml; 8 µg/ml (M9- und XMM-Medium)
Kanamycin	50 µg/ml	---
Neomycin	---	50 µg/ml; 8 µg/ml (M9- und XMM-Medium)

3.2.2 Kultivierungsbedingungen für *E. coli*

E. coli-Stämme wurden bei 37°C und 125 rpm in einem Luftschüttler (SM30, Edmund Bühler GmbH, Tübingen) als Flüssigkulturen in Erlenmeyerkolben mit Schikane kultiviert. Das Bakterienwachstum wurde durch das Messen der optischen Dichte bei 600 nm (oD_{600}) in Plastikküvetten „halb-mikro“ (Greiner Bio One GmbH, Frickenhausen) im *Photometer Ultraspec 2100 pro* (Amersham Biosciences, USA) ermittelt. Eine oD_{600} von 1 entspricht einer Kulturdichte von etwa 10^9 Zellen pro ml. Für die Herstellung chemisch-kompetenter *E. coli* DH5αMCR (siehe Abschnitt 3.5.1) wurden die Bakterien in 25 ml LB-Medium über Nacht vorkultiviert. Zur Isolierung von Plasmid-DNA (siehe Abschnitt 3.3.1.1) aus *E. coli* DH5αMCR wurden die Bakterien über Nacht in 4 ml oder 100 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum (Tabelle 6) in Reagenzgläsern oder Erlenmeyerkolben mit Schikane über Nacht

bei 37°C und ~190 rpm (*Gio Gyrotory Shaker*, New Brunswick Scientific, New Jersey, USA) bzw. 125 rpm (SM30, Edmund Bühler GmbH, Tübingen) vorkultiviert.

3.2.3 Kultivierungsbedingungen für *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*

Standardmäßig wurden *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*-Stämme in 25 ml TBY-Medium mit entsprechendem Antibiotikum bei 26°C und 125 rpm über Nacht in einem Luftschüttler (SM30, Edmund Bühler GmbH, Tübingen) in Erlenmeyerkolben mit Schikane kultiviert. Die optische Dichte wurde wie in Abschnitt 3.2.2 beschrieben bei 580 nm (oD_{580}) bestimmt.

Zur Isolierung von Gesamt-RNA aus einer TBY-Kultur wurden 50 ml TBY-Medium mit der Übernacht Kultur auf eine oD_{580} von 0,12 angeimpft und die Bakterien wurden bis zu einer oD_{580} von 0,5-0,6 kultiviert. Zur RNA-Isolierung aus einer M9- oder XMM-Kultur wurden 50 ml des entsprechenden Mediums abends mit einer 25 ml Kultur in TBY-Medium auf eine oD_{580} von 0,12 angeimpft. Die Kultivierung erfolgte bis zu einer oD_{580} von 0,4-0,5. Für die Proteinisolierung wurden 100 ml TBY-Medium mit der Übernacht-Kultur auf eine oD_{580} von 0,2 angeimpft und etwa 6-8 h kultiviert. Anschließend wurden 450 ml M9- bzw. XMM-Medium mit dieser Kultur auf eine oD_{580} von 0,15 gebracht. Die Kultur wurde über Nacht bis zu einer oD_{580} von 0,5-0,8 kultiviert. Zur Herstellung von kompetenten *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*-Stämmen wurden 100 ml TBY-Medium mit einer 25 ml Übertag-Kultur auf eine oD_{580} von 0,2 angeimpft und über Nacht kultiviert. Um Fluoreszenzmessungen aus den Medien M9 und XMM durchzuführen, wurden 25 ml der entsprechenden Medien mit einer 25 ml TBY-Vorkultur auf eine oD_{580} von 0,1 angeimpft und über Nacht bis zu einer oD_{580} von 0,4-0,5 kultiviert.

3.2.4 Infektion von Tomatenpflanzen

3.2.4.1 Wurzelinfektion

Für die Infektion zehn Tage alter Tomatenpflanzen (*S. lycopersicum* cv. Moneymaker) wurde eine Wurzelinfektion durchgeführt (Engemann, 2006). Dabei wurden *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*-Stämme wie in Abschnitt 3.2.3 beschrieben in 25 oder 50 ml TBY-Medium über Nacht kultiviert. Nach einem Zentrifugationsschritt (5400 x g, 10-20 min, 4°C) wurde das Pellet in 10 mM $MgCl_2$ resuspendiert, die oD_{580} der Suspension bestimmt und ein weiteres Mal zentrifugiert. Die oD_{580} wurde anschließend im entsprechenden Volumen auf 4 eingestellt. Die Wurzeln 10 Tage alter Pflanzen wurden von Erde befreit, leicht verletzt, um das Eindringen der Bakterien zu ermöglichen, und 15 min in Bakteriensuspension inkubiert. Die Pflanzen wurden anschließend einzeln eingetopft. Alle zwei Tage wurden sich entwickelnde

Krankheitssymptome protokolliert. Das Pflanzenwachstum erfolgte bei 17 h Lichteinwirkung (50 klx) und 7 h Dunkelheit, einer Luftfeuchtigkeit von 40 % und einer Temperatur von 26,5°C.

3.2.4.2 Petiolusinfektion

Für die Petiolusinfektion (Engemann, 2006) vier Wochen alter Tomatenpflanzen wurden die Bakterien wie in Abschnitt 3.2.4.1 beschrieben behandelt. Anstelle von 10 mM $MgCl_2$ wurde jedoch PS-Puffer verwendet. Mit einem sterilen Skalpell, das zuvor in die Bakteriensuspension getaucht wurde, wurde eines der Cotyledonen abgeschnitten und die Schnittstelle mit der Suspension bedeckt. Alle zwei Tage wurden sich entwickelnde Krankheitssymptome protokolliert.

PS-Puffer (1l):
7 g Na_2HPO_4, 3 g KH_2PO_4, 5 g NaCl; pH 7; Sterilisation durch Autoklavieren

3.2.4.3 Sameninfektion

Die Samen aus *S. lycopersicum* cv. Moneymaker wurden sterilisiert, bevor sie für Infektionsversuche verwendet wurden. Die Sterilisation wurde am Lehrstuhl für Biochemie (Universität Erlangen-Nürnberg) durchgeführt. Dabei wurden etwa 100 Samen für drei Minuten in 70%igem (v/v) Ethanol inkubiert. Nach dem Entfernen des Ethanols wurde so viel 1%iges (v/v) Natriumhypochlorit zugegeben, bis die Samen bedeckt waren. Während der anschließenden Inkubationszeit von 5 ½ min, wurde die Lösung geschüttelt und danach abgesaugt. Die Samen wurden im Folgenden so lange mit H_2O_{bidest} gewaschen, bis kein Schäumen mehr beobachtet wurde. Das Trocknen der Samen erfolgte in einer Petrischale (Greiner Bio One GmbH, Frickenhausen) auf sterilem Filterpapier (Schleicher & Schuell, Dassel), die Lagerung bei 4°C. Für die Infektion wurden *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*-Stämme wie in Abschnitt 3.2.3 beschrieben kultiviert, zentrifugiert (5.400 x g, 10 min, 4°C) und in 10 mM $MgCl_2$ aufgenommen, wobei eine oD_{580} von 8 eingestellt wurde. Die sterilen Samen wurden für 15 min in der jeweiligen Bakteriensuspension inkubiert und anschließend mit einem Abstand von etwa einem Zentimeter in ein Weckglas (Weck GmbH und Co. KG, Wehr) mit je 200 ml MS-Agar (MS: Murashige-Skooge, Pflanzennährmedium; Murashige & Skoog, 1962) ausgelegt. Die Inkubation erfolgte im Lichtschrank (Hell-Dunkel-Rhythmus: 16 h/8 h; 150µEinstein Lichtintensität; 21°C/19°C). Nach sieben Tagen bzw. vier Wochen wurden fünf Samen bzw. zwei Keimlinge pro Stamm in Samenhülle, Wurzel, Hypocotyl und Blattknospe bzw. Samen, Wurzel, Stängel, Keimblatt und Blatt aufgeteilt und diese jeweils in 500 µl 10 mM K_3PO_4-Puffer, wenn nötig mit entsprechendem Antibiotikum,

über Nacht bei 26°C und 500 rpm inkubiert (*TS 100 Thermoshaker*, peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen), damit die Bakterien aus dem Pflanzenmaterial in den Puffer gelangen konnten. Der Puffer wurde anschließend auf TBY-Platten mit Antibiotikum ausplattiert und die Platten wurden für zwei bis drei Tage bei 28°C inkubiert.

MS-Medium (1l):
4,4 g MS, 0,1 g MES, 8 g Phytoagar, pH (NaOH) 6,1; Sterilisation durch Autoklavieren; Zugabe von 100 ml 30 % (w/v) Saccharose (sterilfiltriert)

3.2.5 Infektion von Tabakpflanzen

Die Infektion vier Wochen alter Tabakpflanzen (*N. tabacum* cv. Samsun NN und *N. benthamiana*) erfolgte durch Blattinfiltration (N. Kocal, Universität Erlangen-Nürnberg, mündliche Mitteilung, 2010). Dazu wurden die *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*-Stämme wie in Abschnitt 3.2.3 beschrieben in 25 oder 50 ml TBY-Medium über Nacht kultiviert und weiter wie in Abschnitt 3.2.4 beschrieben behandelt. Die End-oD_{580} wurde auf 4 eingestellt. Jeweils eine Pflanze wurde an ein bis zwei Blättern mit einem Bakterienstamm durch Infiltration der Suspension in das untere Blattgewebe infiziert. Alle zwei Tage wurden sich entwickelnde Krankheitssymptome protokolliert. Für eine anschließende RNA-Isolierung wurden 0, 24 und 48 h nach der Infiltration pro Stamm ein Drittel eines infizierten Blattes in Alufolie verpackt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Das Pflanzenwachstum erfolgte bei 17 h Lichteinwirkung (50 klx) und 7 h Dunkelheit, einer Luftfeuchtigkeit von 40 % und einer Temperatur von 25,9°C.

3.2.6 Isolierung des Xylemsaftes aus Tomatenpflanzen

Die Isolierung des Xylemsaftes aus vier Wochen alten Tomatenpflanzen erfolgte in Anlehnung an das Protokoll von Rellán-Álvarez und Kollegen (Rellan-Alvarez *et al.*, 2011). Die Stängel wurden etwa 10 cm über den Keimblättern abgeschnitten. Um eine Kontamination mit dem Phloemsaft zu vermeiden, wurde der Xylemsaft erst nach 5 min gesammelt. Nach der Sterilisation durch Filtration wurde der Xylemsaft bei -20°C gelagert.

3.3 Molekularbiologische Techniken

3.3.1 DNA-Techniken

3.3.1.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Für die Plasmidisolierung wurden *E. coli* wie in Abschnitt 3.2.2 beschrieben kultiviert. Für die Isolierung von kleinen Plasmidmengen wurde das *NucleoSpin*® Plasmid-Kit (Macherey-Nagel, Düren) verwendet. Um größere DNA-Mengen zu isolieren, wurde das *NucleoBond*® *Xtra Midi* Kit (Macherey-Nagel, Düren) eingesetzt. Die Isolierung erfolgte nach Angaben des Herstellers. Die Konzentrationsbestimmung wurde mittels *Nanodrop*® *ND1000 Spectrophotometer* (peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen) durchgeführt.

3.3.1.2 Isolierung chromosomaler DNA aus *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*

Zur Isolierung von chromosomaler DNA aus *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* wurden die Bakterien wie in Abschnitt 3.2.3 erläutert kultiviert und in Anlehnung an das Protokoll für *Corynebacterium glutamicum* weiter behandelt (Eikmanns *et al.*, 1994). Nach einem Zentrifugationsschritt (4.000 x g, 10 min, 4°C), wurde das Zellpellet in 4 ml TE-Puffer gewaschen und anschließend in 1 ml TE-Puffer resuspendiert. Nach Zugabe einer Spatelspitze Lysozym und mehrmaligem Invertieren wurde die Zellsuspension für 3 h bei 37°C inkubiert (400 rpm, HeizThermoMixer, MHR20/23, HLC BioTech, Bovenden). Anschließend wurden 3 ml TE-Puffer, 110 µl 20%iges (w/v) SDS und 150 µl 10 mg/ml Proteinase K-Lösung zugegeben, die Suspension wurde mehrfach invertiert und über Nacht bei 55°C inkubiert. Es folgte die Zugabe von 6 M NaCl in 100 µl-Portionen, bis ein feiner weißer körniger Niederschlag sichtbar wurde, der durch Zentrifugation (4.000 x g, mindestens 30 min, Raumtemperatur) sedimentiert wurde. Zum Überstand wurde 1 Vol. kalter 100%iger (v/v) Ethanol gegeben und es wurde mehrmals invertiert. Die so präzipitierte DNA wurde in ein frisches Reaktionsgefäß transferiert und mit 70%igem (v/v) Ethanol (13.000 x g, 10 min, Raumtemperatur) gewaschen. Im Anschluss daran wurde die DNA bei Raumtemperatur getrocknet und in TE-Puffer aufgenommen. Der Lösevorgang erfolgte mindestens über Nacht bei Raumtemperatur.

TE-Puffer:
10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH (HCl) 8,0; Sterilisation durch Autoklavieren

3.3.1.3 Polymerase-Kettenreaktion

Für die *in vitro*-Vervielfältigung spezifischer DNA-Sequenzen wurde die Polymerasekettenreaktion (PCR) eingesetzt (Mullis *et al.*, 1986). Dazu wurden je zwei Oligonukleotide (*Primer*, vorwärts und rückwärts) verwendet, die den zu amplifizierenden DNA-Bereich flankierten. Ein wiederholter Zyklus aus DNA-Denaturierung, *Primer*-Anlagerung (*Annealing*) und *Primer*-Verlängerung (Elongation) über eine hitzestabile DNA-Polymerase ermöglichte die Synthese

des gewünschten DNA-Fragments. Die spezifische *Annealing*-Temperatur der Oligonukleotide wurde so gewählt, dass sie etwa 3-5°C unter der jeweiligen Schmelztemperatur lag. Die Schmelztemperatur berechnet sich aus der Summe von GC- und AT-Basenpaaren, wobei 4°C für die Trennung von Wasserstoffbrücken pro GC- und 2°C pro AT-Basenpaar benötigt werden. DNA-Sequenzen für nachfolgende Klonierungs-Experimente wurden mit der *Phusion* DNA-Polymerase (NEB, Schwalbach), die eine zusätzliche *proofreading*-Aktivität besitzt, amplifiziert. Folgte der Amplifikation keine Klonierung, wurde die *Taq* DNA-Polymerase (NEB, Schwalbach) gewählt. Die eingesetzten Oligonukleotide können der Tabelle 4 entnommen werden. Als *template* diente Plasmid-DNA (siehe Abschnitt 3.3.1.1), direkt von der Agar-Platte abgenommenes und in H_2O_{bidest} resuspendiertes Zellmaterial (Kolonie-PCR) oder RNA für die Überprüfung einer Kontamination durch DNA. Die Reaktion wurde in *Primus 96-Cyclern* (peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen) oder im *MyiQ*^{TM} *i-Cycler* (Biorad, München) durchgeführt.

<u>20 µl PCR-Ansatz (*Taq*-Polymerase):</u>
2 µl 10 x PCR-Puffer für *Taq*-Polymerase
2 µl 25 mM $MgCl_2$
10 µl Bakteriensuspension in H_2O_{bidest} (vorher: 10 min, 95°C)
(oder: 1 µl RNA-Lösung)
0,5 µl Vorwärts-*Primer* (10 pmol/µl)
0,5 µl Rückwärts-*Primer* (10 pmol/µl)
1 µl 10 mM dNTP-Mix (peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen)
0,2 µl *Taq*-DNA-Polymerase
3,8 µl H_2O_{bidest} (12,8 µl H_2O_{bidest})

<u>50 µl PCR-Ansatz (*Phusion*-Polymerase):</u>
10 µl 5 x *Phusion*-DNA-Polymerase Puffer (GC, NEB, Schwalbach)
12 µl 10%iges (v/v) DMSO
10 µl Bakteriensuspension in H_2O_{bidest} (vorher: 10 min, 95°C)
(oder: 1,5 µg Plasmid-DNA)
1 µl Vorwärts-*Primer* (10 pmol/µl)
1 µl Rückwärts-*Primer* (10 pmol/µl)
1 µl 10 mM dNTP-Mix (peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen)
0,5 µl *Phusion*-DNA-Polymerase
14,5 µl H_2O_{bidest} (x µl H_2O_{bidest})

Nach der initialen Denaturierung für 10 min bei 95°C (*Taq*) oder 98°C (*Phusion*) wurde das DNA-Fragment in 30-35 Zyklen amplifiziert, die sich aus Denaturierung (30 sek), *Primer*-Anlagerung (*Annealing*, 30 sek, spezifische Temperatur) und Elongation (vollständige Synthese eines DNA-Doppelstranges) bei 68°C (*Taq*: 1 kbp/min) oder 72°C (*Phusion*: 1 kbp/30 sek) zusammensetzten. Die DNA-Synthese wurde durch eine terminale Elongation (7 min, 68°C/72°C) beendet. Zur Größenbestimmung sowie zur Reinigung der amplifizierten Fragmente wurden die PCR-Ansätze mittels Agarose-Gelelektrophorese analysiert (siehe Abschnitt 3.3.1.5) und, falls nötig, mit dem *NucleoSpin® Extract II* Kit (Macherey-Nagel, Düren) nach Angaben des Herstellers gereinigt.

3.3.1.4 Restriktion von DNA

Um verschiedene DNA-Fragmente ligieren zu können, benötigt es kompatible Schnittstellen. Deshalb wurden Vektor und Insert mit einem oder zwei Restriktionsenzym/en nach Angaben des Herstellers (NEB, Schwalbach) in 30 µl Gesamtvolumen geschnitten. Eine Restriktion wurde außerdem zur Kontrolle klonierter und isolierter Plasmide durchgeführt. Dabei wurde ein 10 µl Ansatz gewählt.

<u>30 µl (*10 µl*) Restriktions-Ansatz:</u>
1,5 µg Plasmid-DNA (*0,5 µg*)
(oder 20 µl Insert-DNA nach Reinigung)
3 µl 10 x NEB-Puffer (*1 µl*)
3 µl 10 x BSA (optional) (*1 µl*)
1 µl Restriktionsenzym I (*0,5 µl*)
1 µl Restriktionsenzym II (optional) (*0,5 µl*)
x µl H_2O_{bidest}

Für die Restriktion mit Plasmid-DNA wurden zusätzlich 0,5 µl CIP (*calf intestine phosphatase*, Roche, Mannheim) zugegeben, um eine Dephosphorylierung der 5‘-DNA-Enden zu gewährleisten und damit eine Religation des Plasmids zu verhindern. Die Inkubation erfolgte für 1 h bei 37°C. Bei einem folgenden *Southern Blot* (siehe Abschnitt 3.3.1.9) wurde die Inkubation über Nacht durchgeführt. Wenn nötig wurden die Enzyme anschließend bei 65°C oder 80°C für 20 min inaktiviert.
Der Erfolg der Restriktion wurde anschließend mittels Agarose-Gelelektrophorese untersucht (siehe Abschnitt 3.3.1.5). Für Klonierungen wurden entsprechende DNA-Fragmente aus dem Gel ausgeschnitten und die DNA wurde daraus extrahiert (siehe Abschnitt 3.3.1.5).

3.3.1.5 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA

Zur Größenauftrennung und Qualitätsbestimmung von Nukleinsäuren wurden 1-4%ige (w/v) Agarose-Gele in 1 x TAE-Puffer (Sambrook *et al.*, 1989) eingesetzt. Die zu analysierenden Proben wurden mit 6 x Ladepuffer (Sambrook *et al.*, 1989) versetzt und auf das Gel aufgetragen. Als Referenz wurde ein DNA-Marker mitgeführt (peqGOLD DNA-Leiter, 100-10.000 bp, peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen). Die Proben wurden mit einer Spannung von etwa 10 V/cm Gellänge aufgetrennt, wobei als Laufpuffer 1 x TAE-Puffer diente. Die DNA wurde durch eine etwa 10-minütige Inkubation in einem Ethidiumbromidbad gefärbt und anschließend durch eine Geldokumentationsanlage (*Doc Print 1000 Gel documentation*, peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen) sichtbar gemacht. Ethidiumbromid interkaliert in die DNA, die Detektion der DNA-Banden erfolgt durch Fluoreszenzanregung von Ethidiumbromid mit UV-Licht (λ = 366 nm). Zur Isolierung wurde die DNA aus dem Gel ausgeschnitten und mittels *NucleoSpin® Extract II* Kit (Macherey-Nagel, Düren) nach Angaben des Herstellers isoliert. Die Konzentrationsbestimmung wurde bei 260 nm im *Nanodrop® ND1000 Spectrophotometer* (peqlab, Biotechnologie GmbH, Erlangen) bestimmt. Die Reinheit wurde über den Quotienten von A_{260}/A_{280} analysiert, der bei reiner DNA zwischen 1,8 und 2,0 liegt.

1 x TAE-Puffer:
40 mM Tris, 1,14 ml Essigsäure, 1 mM EDTA, pH 8,5

6 x Ladepuffer:
0,25 % (w/v) Bromphenolblau, 0,25 % (w/v) Xylencyanol FF, 40 % (w/v) Saccharose

3.3.1.6 Ligation von DNA

Ligationen von geschnittener Plasmid-DNA und geschnittenem DNA-Fragment (3.3.1.3-3.3.1.5) wurden unter Verwendung der T4-DNA-Ligase (NEB, Schwalbach) durchgeführt.

10 µl Ligations-Ansatz:
x µl Plasmid-DNA (50-100 ng)
x µl DNA-Fragment (3-5-facher Überschuss)
1 µl T4 DNA Ligase Puffer (NEB, Schwalbach)
0,5 µl T4 DNA Ligase (NEB, Schwalbach)
x µl H_2O_{bidest}

Die Menge an einzusetzendem DNA-Fragment wurde aus dem Produkt der Überschussmenge, der Plasmidmenge und der Fragmentgröße in bp dividiert durch die

Plasmidgröße in bp berechnet. Die Inkubation erfolgte für 1 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 16°C. Es folgte die Transformation von kompetenten *E. coli* DH5*α*MCR (siehe Abschnitt 3.5.2).

3.3.1.7 DNA-Sequenzierung

Sequenzierungsreaktionen wurden durch GATC Biotech (Konstanz) vorgenommen. Dazu wurden 20-30 µl Plasmidlösung (30-100 ng/µl) sowie 20 µl *Primer*-Lösung (10 µM) verschickt. Alle Ergebnisse wurden mittels *Clone Manager* Software (Sci-Ed, North Carolina, USA) ausgewertet.

3.3.1.8 DNA-Sondenherstellung und -test

Zur spezifischen Detektion von DNA-Fragmenten in DNA-Hybridisierungsexperimenten wurde zunächst eine DNA-Sonde hergestellt. Dazu wurde ein spezifisches 300-500 bp DNA-Fragment mittels PCR amplifiziert (siehe Abschnitt 3.3.1.3), gelelektrophoretisch aufgetrennt und aus dem Gel isoliert (siehe Abschnitt 3.3.1.5). Die Menge des DNA-Fragments wurde auf 1 µg in 16 µl H_2O_{bidest} eingestellt. Nach einer 10 minütigen Inkubation bei 95°C wurden 4 µl *DIG High Prime* (Roche Diagnostics, Mannheim) zugefügt. Nach einer weiteren Inkubation für 20 h bei 37°C wurde die Reaktion durch die Zugabe von 0,2 µl 0,2 M EDTA und einer weiteren Inkubation für 10 min bei 65°C gestoppt.

Die so hergestellte DNA-Sonde wurde anschließend auf ihre Effizienz hin getestet. Dabei wurde 1 µl Sondenlösung (unverdünnt sowie 1:10 und 1:100 in H_2O_{bidest} verdünnt) auf eine positiv-geladene Nylonmembran (Roche Diagnostics, Mannheim) getropft. Die Fixierung an die Membran wurde durch UV-Strahlung (2 x *Autocrosslink*, *UV-Stratalinker® 1800*, Stratagene, Heidelberg) gewährleistet. Die Blockierung der Membran erfolgte durch Inkubation für 30 min in 1 x Blockierungslösung (Roche Diagnostics, Mannheim) auf der Wippe (GFL mbH, Burgwedel). Anti-DIG alkalische Phosphatase (*alkaline phosphatase*: AP) konjugiertes Fab-Fragment (Roche Diagnostics, Mannheim) wurde in einer 1:10.000 Verdünnung zugefügt und es wurde wiederum für 30 min inkubiert. Es folgten zwei Waschschritte für je 15 min in Waschpuffer und eine Äquilibrierung der Membran für einige Minuten in Detektionspuffer. Anschließend wurde die Membran für Hybridisierungsexperimente mit DNA in 10 ml Detektionspuffer mit 200 µl NBT/BCIP (Roche Diagnostics, Mannheim) im Dunkeln inkubiert. Durch die Zugabe von TE-Puffer wurde die Farbentwicklung gestoppt. Für Hybridisierungsexperimente mit RNA wurde die Membran in 990 µl Detektionspuffer mit 10 µl CSPD-Reagenz (Roche Diagnostics, Mannheim) für 15 min bei 37°C im Dunkeln inkubiert. Die Lichtemission wurde daraufhin mittels *Chemidoc™ XRS*$^+$ molekularer *Imager* (Biorad, München) für 2 h detektiert.

1 x Blockierungslösung

10 x Blockierungslösung (Roche Diagnostics, Mannheim) wurde kurz vor dem Gebrauch mit 1 x Maleinsäurepuffer auf 1 x Blockierungslösung verdünnt.

1 x Maleinsäurepuffer

0,1 M Maleinsäure, 0,15 M NaCl, pH 7,5; Sterilisation durch Autoklavieren

1 x Waschpuffer

1 x Maleinsäurepuffer + 0,3 % (v/v) Tween20 (steril)

Detektionspuffer

0,1 M Tris, 0,1 M NaCl, pH 9,0; Sterilisation durch Autoklavieren

TE-Puffer:

10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH (HCl) 8,0, Sterilisation durch Autoklavieren

3.3.1.9 DNA-Hybridisierung (*Southern Blot*)

Zum Nachweis von Insertionsmutanten von *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* wurden DNA-Hybridisierungsexperimente durchgeführt. Dazu wurde das *DIG High Prime DNA Labelling and Detection Starter* Kit I (Roche Diagnostics, Mannheim) verwendet. Zur spezifischen Detektion der DNA-Fragmente wurde zunächst eine DNA-Sonde hergestellt und diese auf ihre Effizienz hin getestet (siehe Abschnitt 3.3.1.8).

Für die *Southern Blot*-Analyse wurden 4 µg chromosomale DNA von *Cmm*382 sowie möglicher Insertionsmutanten mit Hilfe von geeigneten Restriktionsenzymen (NEB, Schwalbach) über Nacht in einem Gesamtvolumen von 20-30 µl bei 37°C geschnitten (siehe Abschnitt 3.3.1.4). Die DNA wurde anschließend gelelektrophoretisch aufgetrennt (siehe Abschnitt 3.3.1.5). Als Kontrolle wurde ein mit Digoxigenin markierter DNA-Marker (DNA *Molecular Weight Marker* VII, Roche Diagnostics, Mannheim) mit auf das Gel aufgetragen. Das Gel wurde nach dem Lauf von etwa 1-1½ h, 15 min in Depurinierungslösung, 2 x 15 min in Denaturierungslösung und 2 x 10 min in Neutralisierungslösung auf der Wippe (GFL mbH, Burgwedel) inkubiert. Es folgte eine Übertragung der DNA auf eine positiv geladene Nylonmembran (Roche Diagnostics, Mannheim) mittels Kapillarblot (*VacuGene* Vakuum-Pumpe, GE Healthcare, Freiburg) für 2 h bei 50 mbar, wobei eine ständige Beschichtung des Gels mit 20 x SSC gewährleistet wurde. Die Fixierung der DNA an die Membran wurde durch UV-Strahlung (2 x *Autocrosslink*, *UV-Stratalinker® 1800*, Stratagene, Heidelberg) gewährleistet. Die Membran wurde anschließend in 10 ml *DIG Easy Hyb* (Roche Diagnostics,

Mannheim) für 30 min bei 42°C im Hybridisierungsofen (*HYBAID*^{TM}, Biometra, Göttingen) inkubiert. Nach der Zugabe von 3-5 µl Sonden-DNA (siehe Abschnitt 3.3.1.8), die zuvor für 5 min bei 95°C denaturiert wurde, erfolgte eine Inkubation über Nacht bei 50°C im Hybridisierungsofen (*HYBAID*^{TM}, Biometra, Göttingen). Es folgten vier Waschschritte, wobei die ersten zwei für 5 min bei Raumtemperatur in 2 x SSC + 0,1 % (w/v) SDS erfolgten und die folgenden zwei für 15 min bei 68°C in 0,2 x SSC + 0,1 % (w/v) SDS. Alle weiteren Schritte wurden bei Raumtemperatur auf der Wippe (GFL mbH, Burgwedel) durchgeführt. Einem dreiminütigen Waschschritt folgte die Blockierung für eine Stunde in 1 x Blockierungslösung. Die weitere Durchführung erfolgte analog zum Sondentest (siehe Abschnitt 3.3.1.8).

Depurinierungslösung:
0,25 M HCl; Sterilisation durch Autoklavieren

Denaturierungslösung:
1,5 M NaCl, 0,5 M NaOH; Sterilisation durch Autoklavieren

Neutralisierungslösung:
1,5 M NaCl, 0,5 M Tris, pH (HCl) 7,5; Sterilisation durch Autoklavieren

20 x SSC :
3 M NaCl, 0,3 M Tri-Natriumcitrat, pH 7; Sterilisation durch Autoklavieren

2 x SSC + 0,1 % (w/v) SDS
20 x SSC mit H_2O_{bidest} 1:10 verdünnt; Sterilisation durch Autoklavieren; + 0,1 % (w/v) SDS

0,2 x SSC+ 0,1 % (w/v) SDS
20 x SSC mit H_2O_{bidest} 1:100 verdünnt; Sterilisation durch Autoklavieren; + 0,1 % (w/v) SDS

1 x Blockierungslösung
10 x Blockierungslösung (Roche Diagnostics, Mannheim) wurde kurz vor dem Gebrauch mit 1 x Maleinsäurepuffer auf 1 x Blockierungslösung verdünnt.

1 x Maleinsäurepuffer:
0,1 M Maleinsäure, 0,15 M NaCl, pH (NaOH) 7,5; Sterilisation durch Autoklavieren

3.3.2 RNA-Techniken

3.3.2.1 RNA-Isolierung aus C. michiganensis subsp. michiganensis

Zur Isolierung von Gesamt-RNA wurden *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* wie beschrieben kultiviert (siehe Abschnitt 3.2.3). Die gesamte Kultur wurde zentrifugiert (5.400 x g, 10 min, 4°C), die Zellpellets wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Aufbereitung bei -80°C gelagert. Die Isolierung der RNA erfolgte mit Hilfe des *NucleoSpin® RNA II* Kits (Macherey-Nagel, Düren). Dazu wurde das Zellpellet nach dem Auftauen auf Eis in 350 µl RA1-Puffer mit 1 % (v/v) *β*-Mercaptoethanol resuspendiert und die Suspension daraufhin in 2 ml Cryoröhrchen mit 300 mg Glasperlen (Durchmesser 0,2-0,3 mm) transferiert. Der Zellaufschluss erfolgte durch zweimaliges hochfrequentes Schütteln im *Precellys 24* Homogenisator (peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen) für 30 s bei 6,5 m/s. Zwischen den Intervallen wurde die Suspension für 3 min auf Eis gekühlt. Glasperlen und Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation (13.000 x g, 3 min, 4°C) sedimentiert, die Überstände mit 350 µl 70%igem (v/v) Ethanol gemischt und die Lösungen auf Säulchen mit blauem Ring gegeben. Die weitere Isolierung wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt, wobei die RNA für 15 min mit rDNase (Macherey-Nagel, Düren) inkubiert wurde. Der RNA-Isolierung folgte eine Behandlung mit der TURBO-DNase (Ambion, Austin, USA), um noch vorhandene DNA abzubauen. Anschließend wurde die RNA erneut mit dem *NucleoSpin® RNA II* Kit (Macherey-Nagel, Düren) gereinigt. Die Konzentration der RNA wurde am *Nanodrop® ND1000 Spectrophotometer* (peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen) bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Die Reinheit sollte dabei für A_{260}/A_{280} zwischen 2,0 und 2,2 liegen.

3.3.2.2 RNA-Isolierung aus *N. tabacum* cv. Samsun NN

Die Isolierung der RNA aus Tabakpflanzen wurde mit Hilfe des *RNeasy Plant Mini* Kits (Qiagen, Hilden) durchgeführt. 150 mg Blattproben von bakteriell- und $MgCl_2$-behandelten Tabakpflanzen, die in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert worden waren, wurden mittels Mörser und Pistill (Haldenwanger, Waldkraiburg) homogenisiert. Dabei wurde das Blattmaterial unter Zugabe von flüssigem Stickstoff so lange bearbeitet, bis ein feines Pulver entstanden war. Es wurden sofort 450 µl RLT-Puffer mit 1 % (v/v) ß-Mercaptoethanol zugegeben und es wurde so lange gemörsert, bis eine homogene Flüssigkeit entstanden war. Nach Überführung der Blatt-Suspension in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß und dem Mischen durch Vortexen, wurde die Suspension auf eine *QIAshredder* Säule (lila) übertragen und es wurde bei 13.000 x g für 2 min zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand des Durchflusses in ein neues Reaktionsgefäß überführt

und bei -80°C bis zur weiteren Verwendung eingefroren. Das Lysat wurde daraufhin vorsichtig bei 37°C aufgetaut und es wurden etwa 225 µl 96%iges (v/v) Ethanol zugegeben. Die weitere Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers, wobei die RNA in 92 µl RNase-freiem Wasser eluiert wurde. Es folgte ein weiterer Schritt zum Abbau noch vorhandener DNA mittels TURBO-DNase (Ambion, Austin, USA). Anschließend wurde die RNA erneut mit dem *RNeasy Plant Mini* Kit (Qiagen, Hilden) behandelt. Die Konzentration der RNA wurde am *Nanodrop® ND1000 Spectrophotometer* (peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen) bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Die Reinheit sollte dabei für A_{260}/A_{280} zwischen 2,0 und 2,2 liegen.

3.3.2.3 Gelelektrophoretische Auftrennung von RNA

Die Qualität der RNA-Proben (siehe Abschnitt 3.3.2.1 und 3.3.2.2) wurde mittels Gelelektrophorese untersucht. 3 µl Probe wurden dazu mit 5 µl RNA-Ladepuffer versetzt und in einem Agarose-Gel aufgetrennt (siehe Abschnitt 3.3.1.5). Der Erfolg der RNA-Isolierung wurde durch die 16 S und die 23 S rRNA-Banden angezeigt.

10 x MOPS-Puffer:
200 mM MOPS, 50 mM Natriumacetat, 10 mM EDTA, pH (NaOH) 7,0

RNA-Ladepuffer:
2 x MOPS-Puffer, 0,2 % (w/v) Bromphenolblau, 0,2 % (w/v) Xylencyanol FF, 65 % (v/v) Formamid, 12 % (v/v) Formaldehyd, 2 % (w/v) Saccharose; Lagerung bei -20°C

3.3.2.4 Herstellung von RNA-Sonden mittels *in vitro*-Transkription

Die für RNA-Hybridisierungen mit spezifischen mRNAs benötigten *antisense* RNA-Sonden wurden über *in vitro*-Transkription hergestellt. Dabei wurde zuerst ein etwa 500 bp großes DNA-Fragment des zu untersuchenden Gens über PCR (siehe Abschnitt 3.3.1.3) amplifiziert. Der verwendete Rückwärts-*Primer* enthielt am 5‘-Ende die Sequenz des T7-Promotors, über den die Synthese der Sonde durch eine T7 RNA-Polymerase gewährleistet wurde. Das amplifizierte PCR-Produkt wurde über Agarose-Gelelektrophorese und anschließender Extraktion (siehe Abschnitt 3.3.1.5) gereinigt. Daraufhin wurde das Fragment als *template* in der *in vitro*-Transkription eingesetzt. Die Markierung der RNA-Sonden erfolgte mit Digoxigenin-11-dUTPs.

20 µl *in vitro*-Transkriptions-Ansatz:

14 µl	gereinigtes PCR-Produkt (10-50 ng/µl)
2 µl	10 x DIG RNA *Labelling-Mix* (Roche Diagnostics, Mannheim)
2 µl	10 x T7 RNA-Polymerase Puffer (NEB, Schwalbach)
2 µl	T7 RNA-Polymerase (NEB, Schwalbach)

Der Reaktionsansatz wurde für 2 h bei 37°C inkubiert. Das als *template* dienende DNA-Fragment wurde anschließend durch Zugabe von 1 µl RNase-freier DNase I (peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen) und 25-minütiger Inkubation bei 37°C abgebaut. Zur Überprüfung der Sondenqualität wurde ein Sondentest durchgeführt (vgl. Abschnitt 3.3.1.8). Die markierte RNA-Sonde wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

3.3.2.5 RNA-Hybridisierung (*Dot Blot*)

Um die Transkription spezifischer Gene zu analysieren, wurden RNA-Hybridisierungsexperimente durchgeführt. Dabei wurden zu 100 µl 10 x SSC (mit wenig Bromphenolblau versetzt) 4 µg Gesamt-RNA aus *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* gegeben. Die RNA-Lösungen wurden auf eine positiv geladene Nylonmembran (Roche Diagnostics, Mannheim) aufgetragen, welche zuvor in RNase-freiem H_2O_{bidest} und anschließend in 10 x SSC äquilibriert und auf ein mit 10 x SSC-getränktes Filterpapier (Schleicher & Schuell, Dassel) gelegt wurde. Für die Übertragung wurde die *Minifold I Dot Blot* Apparatur (Schleicher & Schuell, Dassel) und eine Vakuumpumpe (GE Healthcare, Freiburg) bei 20 mbar verwendet. Nach vollständiger Übertragung der Proben wurde die Membran für 5 min bei 100 mbar getrocknet. Anschließend wurde die RNA durch UV-Bestrahlung im *Crosslinker* (2 x *Autocrosslink*, UV Stratalinker® 1800, Stratagene, Heidelberg) auf der Membran fixiert. Die Membran wurde daraufhin im Hybridisierungsofen (*HYBAID*™ Biometra, Göttingen) für 1 h bei 50°C in 12,5 ml Prähybridisierungslösung blockiert. Nach der Zugabe von 3-5 µl spezifischer, DIG-markierter RNA-Sonde (siehe Abschnitt 3.3.2.4), erfolgte die Hybridisierung über Nacht bei 68°C. Es folgten zwei 15-minütige Waschschritte der Membran mit 2 x SSC + 0,1 % (w/v) SDS bei Raumtemperatur und zwei 25-minütige Waschschritte mit 0,2 x SSC + 0,1 % (w/v) SDS bei 68°C. Anschließend wurde die Membran kurz in 1 x Waschpuffer und danach in 1 x Blockierungslösung für 30 min bei Raumtemperatur auf der Wippe (GFL mbH, Burgwedel) inkubiert. Nach der Zugabe von Anti-DIG AP konjugiertem Fab-Fragment (Roche Diagnostics, Mannheim) in einer Verdünnung von 1:10.000 wurde die Membran für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zum Entfernen von nicht-gebundenem Antikörper wurde die Membran drei Mal 15 min in 1 x Waschpuffer gewaschen. Zum Nachweis der Hybridisierung

wurde die Membran für 5 min in Detektionspuffer äquilibriert, mit CSPD-Lösung (1:100 in Detektionspuffer) benetzt und in Klarsichtfolie gelegt. Nachdem die Membran im Dunkeln für 15 min bei 37°C inkubiert worden war, erfolgte die Detektion der Lichtemission mittels *Chemidoc*^{TM} *XRS*$^{+}$ molekularem *Imager* (Biorad, München) für maximal 2 h.

20 x SSC:
3 M NaCl, 0,3 M Tri-Natriumcitrat, pH (HCl) 7,0; Sterilisation durch Autoklavieren

Prähybridisierungslösung (100 ml):
50 ml Formamid, 20 ml 10 x Blockierungs-Lösung, 25 ml 20 x SSC, 1 ml 10%iges (w/v) N-Lauroylsarkosinat, 100 µl 20%iges (w/v) SDS, 3,9 ml RNase-freies H_2O_{bidest}

1 x Blockierungslösung
10 x Blockierungslösung (Roche Diagnostics, Mannheim) wurde kurz vor dem Gebrauch mit 1 x Maleinsäurepuffer auf 1 x Blockierungslösung verdünnt.

1 x Maleinsäurepuffer:
0,1 M Maleinsäure, 0,15 M NaCl, pH (NaOH) 7,5; Sterilisation durch Autoklavieren

1 x Waschpuffer:
1 x Maleinsäurepuffer mit 0,3 % (v/v) Tween 20 (steril)

Detektionspuffer
0,1 mM Tris, 0,1 M NaCl, pH (HCl) 9,5; Sterilisation durch Autoklavieren

3.3.2.6 Quantitative *real-time* reverse Transkriptase PCR (qPCR)

Um Unterschiede in der Transkriptmenge spezifischer mRNAs erkennen zu können, wurde die quantitative *real-time* reverse Transkriptase (RT) PCR (qPCR) durchgeführt. Dazu wurden Tabakblätter von *N. tabacum* cv. Samsun NN mit *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* wie in Abschnitt 3.2.5 beschrieben infiltriert und behandelt. Die folgende RNA-Isolierung wurde wie in Abschnitt 3.3.2.2 beschrieben durchgeführt. Die qPCR beruht auf der Quantifizierung spezifischer mRNAs, wobei einer reversen Transkription in cDNA eine PCR folgt, bei der das Ziel-Fragment amplifiziert wird. Als *template* wurde Gesamt-RNA verwendet, die Oligonukleotide wurden von MWG (Ebersberg) bezogen und in einer Menge von 0,6-0,8 µM (in H_2O_{bidest} verdünnt) eingesetzt. Die Größe der amplifizierten PCR-Fragmente betrug 100-200 bp. Die Durchführung erfolgte mittels *iScript One-Step RT-PCR* Kit (Biorad, München),

wobei die reverse Transkription und die Amplifikation in einem Schritt erfolgten. Für die Analyse unterschiedlicher Transkriptmengen wurden 10 ng Gesamt-RNA von *N. tabacum* cv. Samsun NN-Blättern verwendet, die mit 10 mM $MgCl_2$, dem Wildtypstamm *Cmm*382 oder dem plasmidfreien Stamm *Cmm*100 behandelt wurden.

25 µl Ansatz:

12,5 µl SYBR-Green® Mix
0,5 µl Vorwärts-*Primer*
0,5 µl Rückwärts-*Primer*
0,5 µl reverse Transkriptase
1 µl H_2O_{bidest}
10 µl Gesamt-RNA

PCR Programm:

	10 min	55°C	reverse Transkription
	10 min	95°C	Denaturierung des DNA/RNA-Hybrids
45 Zyklen	30 sek	95°C	PCR
	30 sek	60°C	
	30 sek	72°C	
	1 min	95°C	Denaturierung
	30 sek	55°C	*Annealing*
81 Zyklen	30 sek	55-95°C	Schmelzkurve

Für alle qPCR-Reaktionen wurde das *MyiQ Single-Color Real Time PCR Detection* System (Biorad, München) verwendet. Die Menge des PCR-Produkts wurde nach jedem der 45 Zyklen durch die Zunahme der Fluoreszenz bestimmt. Der Farbstoff SYBR-Green® bindet nur an doppelsträngige DNA und ist nur durch diese Bindung aktiv. Der ermittelte C_q-Wert beschreibt den PCR-Zyklus, bei dem die Fluoreszenz der Probe den Grenzwert der Hintergrundfluoreszenz erreicht. Liegt der C_q-Wert einer Probe drei Zyklen höher, als bei einer anderen, so war die Transkriptmenge um das 2^3 = 8-fache höher. Neben einem Amplifikationsdiagramm wurde eine Schmelzkurve erstellt, um die Reinheit und Spezifität des PCR-Produkts zu analysieren. Zur Qualitätskontrolle wurde jeweils ein 25 µl Ansatz ohne RNA mitgeführt. Eine zusätzliche Analyse der RNA erfolgte mittels 4%iger (w/v) Agarose-Gelelektrophorese (siehe Abschnitt 3.3.1.5). Dabei sollte nur in den Ansätzen mit RNA das PCR-Produkt zu erkennen sein. War die PCR nicht erfolgreich, waren nur die *Primer*-Dimere erkennbar. Um die richtige RNA-Menge einsetzen zu können, wurden zuerst Verdünnungsreihen mit absteigenden RNA-Mengen von 100-0,01 ng in Zehnerschritten

getestet. Für jede Verdünnungsreihe wurde mit Hilfe der C_q-Werte eine Standardkurve erstellt. Aus der Steigung wurde anschließend die Effizienz der PCR ermittelt. Bei einer Effizienz zwischen 96 und 108,5 % (standardmäßig 90-105 %; *Real-Time PCR Application Guide*, Biorad, München) wurden die *Primer* für weiterführende Experimente verwendet. Mit jeder Probe wurden zwei Replikate durchgeführt, um anschließend die relative Transkriptmenge des Zielgens im Verhältnis zu einem Kontrollgen bestimmen zu können, wobei sich die Expression des Kontrollgens unter den gegebenen Testbedingungen nicht unterscheiden sollte. Die Datenauswertung erfolgte mittels *MyiQ Optical* Software (Biorad, München). Die Analyse der Standardkurven erfolgte mit Hilfe der Anwendungen „*Gene Expression*“ und „*Melt Curves*“, die der Transkriptmengen mit „*Gene Expression Analysis*“. Die relative Expressionsrate wurde gemäß Pfaffl bestimmt (Pfaffl, 2001).

3.3.2.7 cDNA-Microarrays

Für die Analyse des gesamten Transkriptoms von *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* wurden Microarray Chips (Agilent, Santa Clara) verwendet. Für jedes der 3.107 annotierten Gene von *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* (http://cmr.jcvi.org) wurden zwei spezifische Sonden (45-60 bp Länge) mit der Software *eArray* hergestellt (*https://earray.chem.agilent.com*), wobei sowohl Gene des Chromosoms und der beiden natürlichen Plasmide als auch Pseudogene berücksichtigt wurden. Ein Chip enthielt die Oligonukleotide der 3.107 Gene in achtfacher Ausführung. Für jeden Vergleich wurde die Gesamt-RNA (siehe Abschnitt 3.3.2.1) aus zwei bis drei biologischen Replikaten und aus unterschiedlichen Medien verwendet. Mittels *Agilent RNA 6000 Nano Chip* wurde auf einem *Agilent 2100 BioAnalyzer* nach Angaben des Herstellers (*Agilent RNA 6000 Nano Assay Protocol2*) getestet, ob die RNA intakt war. Daraufhin wurden 300 ng RNA mit Hilfe eines zufälligen T7N9 *Primers* (Moreno-Paz & Parro, 2006) in cDNA umgeschrieben. Die Markierung der Proben und die Hybridisierung an die Oligonukleotide wurden im Wesentlichen nach Angaben des Herstellers gemäß des *two-color RNA spike-in* Kits (v5.7, 2008; Agilent Technologies, Santa Clara) durchgeführt. Der Farbstoff Cy5 wurde dabei immer für die Kontroll-Probe verwendet, Cy3 für die zu analysierende Probe. Die Chips wurden mit dem Agilent Microarray Scanner analysiert (XDR - *extended dynamic range*, Auflösung: 5 µm). Die Datenextraktion wurde mittels *Feature Extractions* Software Einheit (v9.5.3.1/ Agilent Technologies) nach einem Standard-Protokoll vorgenommen. Das Umschreiben der RNA in cDNA, die Markierung und nachfolgende Hybridisierung der Proben wurden von S. Reid (Lehrstuhl für Biochemie, Universität Erlangen-Nürnberg) durchgeführt, die Auswertung der Daten erfolgte unter Anleitung von Dr. S. Sonnewald (Lehrstuhl für Biochemie, Universität Erlangen-Nürnberg). Die Software *GeneSpring XI* (Agilent Technologies) wurde unter

Standardeinstellungen für die Datenanalyse gewählt. Statistisch signifikant regulierte Gene (*p-value* <= 0,05) wurden mit Hilfe der Anwendung „*t-test against zero“* und der Benjamini-Hochberg-Korrektur (Benjamini & Hochberg, 1995) identifiziert.

3.3.2.8 5’-RACE

Für die Analyse des Transkriptionsstartpunktes von CMM_1636 (*glnA1*) wurden 5’-*RACE*-Experimente mit Hilfe des 5’/3’ *RACE* Kits (*2nd Generation,* Roche, Mannheim) durchgeführt. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers. Die Gesamt-RNA wurde aus einer *Cmm*382-Kultur in M9- und XMM-Medium isoliert (siehe Abschnitt 3.3.2.1) und es wurden davon etwa 2,8 µg gemeinsam mit dem *Primer glnA*-SP1-rev (Abschnitt 3.1, Tabelle 4) eingesetzt. Zur Reinigung der DNA-Fragmente wurde das *High Pure PCR Product Purification* Kit (Roche, Mannheim) verwendet. Die PCR 1 nach dem *poly-tailing* der cDNA wurde mit einer *Annealing*-Temperatur von 65°C und dem *Primer glnA*-SP2-rev (Abschnitt 3.1, Tabelle 4) im *MyiQ Single-Color Real Time PCR Detection* System (Biorad, München) durchgeführt. Für die Kontroll-PCR wurde eine *Annealing*-Temperatur von 55°C verwendet. Die PCR-Fragmente der Kontroll-PCR wurden mit Hilfe des *Primers glnA*-SP2-rev (Abschnitt 3.1, Tabelle 4) sequenziert (siehe Abschnitt 3.3.1.7).

3.3.2.9 RNA-Sequenzierung

Für die Analyse von Transkriptionsstartpunkten der Gesamt-RNA von *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* wurden die 5’-NTRs (nicht-translatierte Region) und 5’-Enden sequenziert. Dafür wurde der Wildtypstamm wie in Abschnitt 3.2.3 beschrieben kultiviert und die RNA aus einer M9- und TBY-Kultur isoliert (siehe Abschnitt 3.3.2.1). Aus 10 µg RNA wurde anschließend eine Primär-Transkript-Bibliothek am *Center for Biotechnology* (CeBiTec) in Bielefeld erstellt. Dabei wurde die mRNA von rRNAs gereinigt, fragmentiert und mit *Epicentre Exonuclease* (Biozym, Oldendorf) behandelt. Nach dem Entfernen der Tri- und Diphosphate (*Epicentre* RNA 5’-Polyphosphatase, Biozym, Oldendorf) wurde eine 5’-Adapter Ligation durchgeführt, wobei ein RNA-Adapter (5’-CCCUACACGACGCUCUUCCGAUCGAG-3’) an das 5’-Ende der mRNA gehängt wurde. Die reverse Transkription (Transkriptase: Invitrogen GmbH, Karlsruhe) erfolgte mittels Loop-DNA-Adapter (5’-AGATCGGAAGAGAGACGTGTG CTCTTCCGATCTNNNNNNN-3’). Die Adapter-Oligonukleotide wurden über Metabion (Martinsried) bezogen. Es folgten eine cDNA-Amplifizierung mit der *Phusion*-Polymerase (NEB, Schwalbach), ein oder mehrere Aufreinigungsschritt/e mittels *AMPure beads* (Beckmann Coulter, Krefeld) und ständige Analysen mit Hilfe des *DNA High Sensitivity Assays* (Agilent Technologies, Böblingen), um die Qualität er cDNA zu überprüfen. Anschließend wurde die cDNA-Bibliothek sequenziert (Illumina, San Diego, USA).

3.4 Biochemische Techniken

3.4.1 Analyse der Ammoniumkonzentration

Für die Bestimmung der Ammoniumkonzentration wurde ein abgewandelter Indophenoltest nach Jahns und Kollegen durchgeführt (Jahns *et al.*, 1988). Ein spezifisches Probenvolumen wurde mit 50 mM KH_2PO_4-Puffer, pH 7 auf 1 ml aufgefüllt. Nach einer zehnminütigen Inkubation bei 37°C wurden nacheinander je 1 ml Lösung I und II zugegeben und die Probe wurde für 15 min bei 50°C inkubiert. Die Absorption wurde bei einer Wellenlänge von 546 nm bestimmt. Die Ammoniumkonzentration wurde durch den Vergleich mit einer Standardkurve ermittelt, bei der die Absorption unterschiedlicher NH_4Cl-Konzentrationen gemessen wurde.

Lösung I:
4,72 % (v/v) Phenol, 0,025 % (w/v) Natriumnitroprussid

Lösung II:
2,5 % (w/v) Natriumhydroxid, 5,245 % (v/v) Natriumhypochlorit

3.4.2 Analyse der Nitratkonzentration

Für die Bestimmung der Nitratkonzentration wurde das *Nitrate determination* Kit (Roche, Mannheim) verwendet. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers, wobei jeweils nur die Hälfte der vorgegebenen Volumina eingesetzt wurde. Die Absorption wurde bei 340 nm gemessen.

3.4.3 Analyse der Zucker- und Aminosäurenkonzentration

Um die Konzentration von Zuckern (Glucose, Fructose und Saccharose) und Aminosäuren zu bestimmen, wurden dem Probenvolumen von 100 µl 500 µl 100%iges (v/v) Ethanol zugefügt. Der Inkubation für 60 min bei 80°C und einer anschließenden langsamen Abkühlung für 15 min auf Raumtemperatur folgte ein Zentrifugationsschritt (13.000 x g, 5 min). Der Überstand wurde für 60-90 min in einer *Savant DNA SpeedVac* (Thermo Scientific, Langenselbold) vakuumgetrocknet und daraufhin in 250 µl H_2O_{bidest} resuspendiert (= Extrakt). Die weitere Durchführung erfolgte durch J. Hofmann (Lehrstuhl für Biochemie, Universität Erlangen-Nürnberg). Für die Bestimmung der Aminosäuren-Konzentration wurden dafür 10 µl des Extrakts mit Hilfe des Fluorophors *6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccimidyl carbamate* (AQC) (Cohen & Michaud, 1993) derivatisiert. Anschließend wurden davon 10 µl mittels *Reversed Phase* Chromatographie (Dionex Summit P680 HPLC, Idstein) analysiert, wobei

der Fluoreszenz-Detektor RF2000 (Dionex, Idstein) wie von Hofmann und Kollegen beschrieben verwendet wurde (Hofmann *et al.*, 2011). Die Konzentrationen von Glucose, Fructose und Saccharose wurden aus dem ethanolischen Extrakt enzymatisch mittels gekoppeltem optischen Test bei 340 nm ermittelt (nach Stitt *et al.*, 1989). Dabei wurde die Messung von 200 µl Gesamtvolumen im Mikrotiterplatten-*Reader* (BioTek, http://www.biotek.com/) durchgeführt.

3.4.4 Proteinisolierung aus *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*

Für die Isolierung von Oberflächenproteinen sowie extrazellulären und zytoplasmatischen Proteinen aus *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* wurden die Protokolle von Hansmeier und Kollegen sowie Watt und Kollegen in leicht abgewandelter Form verwendet (Watt *et al.*, 2005; Hansmeier *et al.*, 2006a; Hansmeier *et al.*, 2006b). Die Fällung mit Trichloressigsäure (*trichloroacetic acid:* TCA) wurde nach Savidor und Kollegen, Lochner und Kollegen sowie A. Kühn (Georg-August Universität Göttingen, mündliche Mitteilung, 2012) durchgeführt (Lochner *et al.*, 2011; Savidor *et al.*, 2012).

3.4.4.1 Isolierung der Oberflächenproteine

Für die Isolierung von Oberflächenproteinen wurden die Bakterien wie in Abschnitt 3.2.3 beschrieben kultiviert und anschließend pelletiert (5.000 x g, 20 min, 4°C). Die weitere Durchführung erfolgte mit einigen Abwandlungen wie von Hansmeier und Kollegen sowie Watt und Kollegen beschrieben (Watt *et al.*, 2005; Hansmeier *et al.*, 2006a): Nach der Zugabe von 2 % (w/v) Chaps (Serva, Heidelberg) wurde die Suspension über Nacht auf Eis bei 4°C inkubiert. Nach dem anschließenden Zentrifugationsschritt wurde das Lysat filtriert (0,45 µm Filter, Sartorius, Göttingen). Es folgten die Zugabe von 10 ml wassergesättigtem Phenol, eine zweistündige Inkubation bei 4°C auf der Wippe (GFL mbH, Burgwedel) und ein Zentrifugationsschritt (3.500 x g, 30 min, 4°C). Die Zugabe von Methanol erfolgte gleichzeitig mit der Zugabe von 1 M DTT und 8 M NH_4-Acetat. Nach 12-stündiger Inkubation wurden die Proteine pelletiert (3.500 x g, 30 min, 4°C), das Pellet wurde zwei Mal in 5 ml kaltem 70%igem (v/v) Ethanol und ein Mal in kaltem Aceton gewaschen (3.500 x g, 15 min, 4°C), luftgetrocknet und anschließend in 100 µl Rehydratisierungspuffer gelöst. Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

Rehydratisierungspuffer:

8 M Harnstoff, 20 mM DTT, 2 % (w/v) CHAPS

3.4.4.2 Isolierung extrazellulärer und zytoplasmatischer Proteine

Für die Isolierung extrazellulärer Proteine wurden die Bakterien wie in Abschnitt 3.2.3 beschrieben kultiviert und anschließend pelletiert (5.000 x g, 25 min, 4°C). Das Pellet wurde für die Isolierung zytoplasmatischer Proteine verwendet und aus dem Überstand wurden die extrazellulären Proteine isoliert. Die Isolierung zytoplasmatischer Proteine erfolgte wie von Hansmeier und Kollegen beschrieben, wobei zu Beginn zwei Zentrifugationsschritte (5.500 x g, 25 min, 4°C) durchgeführt wurden (Hansmeier *et al.*, 2006a). Der Zellaufschluss erfolgte mit Hilfe des Homogenisators *Precellys 24* (peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen). 2 µl *Benzonase® Nuclease* (Novagen, Darmstadt) wurden zum Entfernen von DNA und RNA eingesetzt. Anstelle von Aceton wurden 10 % (w/v) TCA für die Fällung der Proteine verwendet. Vor der Aufnahme der Proteine in 30 µl Rehydratisierungspuffer wurden diese ein Mal in 80%igem (v/v) und ein Mal in 100%igem (v/v) kaltem Aceton gewaschen (13.000 x g, 30 min, 4°C) und luftgetrocknet. Für die Isolierung extrazellulärer Proteine wurde der Überstand nochmals zentrifugiert (7.500 x g, 60 min, 4°C), in ein neues Gefäß überführt und es wurden drei Proteinase Inhibitor *COMPLETE* Tabletten (Roche, Mannheim) und 10 % (w/v) TCA zugegeben, bevor die Suspension über Nacht bei 4°C inkubiert wurde. Einem Zentrifugationsschritt (5.500 x g, 30 min, 4°C) folgten zwei Waschschritte mit 80%igem (v/v) bzw. 100%igem (v/v) Aceton, bevor die Proteine luftgetrocknet und in 30 µl Rehydratisierungspuffer aufgenommen wurden. Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

Rehydratisierungspuffer:

8 M Harnstoff, 20 mM DTT, 2 % (w/v) CHAPS

3.4.4.3 Isolierung spezifischer Proteine mittels *magnetic beads*

Für die Isolierung putativer Regulatorproteine aus dem Zellextrakt von *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* wurden Strep-Tactin gekoppelte *magnetic beads* (MagStrep *„type2" beads*, IBA GmbH, Göttingen) verwendet. Die Durchführung erfolgte in Anlehnung an das Protokoll von Amon und Kollegen (Amon *et al.*, 2008). Die *beads* aus 2 x 70 µl *magnetic beads* Lösung wurden am Magneten (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) gesammelt und je zwei Mal in 500 µl 1 x PBS + 0,1 % (w/v) BSA und 2 x DNA-Bindepuffer gewaschen. 7 µg gereinigtes PCR-Produkt (siehe Abschnitt 3.3.1.3 und 3.3.1.5), welches zuvor mittels biotinylierter Oligonukleotide (Tabelle 4) markiert wurde, wurde zugefügt und die Suspension wurde für 30 min bei Raumtemperatur und 300 rpm (*TS 100 Thermoshaker*, peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen) inkubiert. Zur Bindung des Proteinextrakts wurden die Bakterien wie in Abschnitt 3.2.3 beschrieben kultiviert und anschließend zentrifugiert (5.500 x g, 20 min, 4°C). Nachdem das Pellet in 4 ml Lyse-Puffer resuspendiert wurde,

folgten zwei Zellaufschlussschritte mittels Homogenisator *Precellys 24* (peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen) für je 30 Sekunden bei 6,5 m/s. Nach einem Zentrifugationsschritt (13.000 x g, 5-10 min, 4°C) wurde der Überstand in 1,5 ml Portionen zu den *magnetic beads* gegeben. Es folgte eine Inkubation für je 45 min bei 4°C und 300 rpm (*TS 100 Thermoshaker*, peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen). Um unspezifische Proteine von den *magnetic beads* zu trennen, wurden diese drei Mal für 10 min, über Nacht und nochmals zwei Mal für 30 min in Protein-Bindepuffer inkubiert. Die Trennung vom Proteinextrakt und vom Puffer erfolgte am Magneten (Invitrogen GmbH, Karlsruhe). Spezifische Proteine wurden durch die Zugabe von Elutionspuffer mit steigenden NaCl-Konzentrationen von 200-900 mM in 100 mM Schritten in einem Volumen von 100 µl eluiert. Für eine Erhöhung der Konzentration wurde die Proteinlösung in einer *Savant DNA SpeedVac* (Thermo Scientific, Langenselbold) vakuumgetrocknet. Die Analyse der Proteine erfolgte mittels SDS-PAGE (siehe Abschnitt 3.4.5) und MALDI-ToF Massenspektrometrie (siehe Abschnitt 3.4.9).

Lyse-Puffer:

50 mM Tris, pH (HCl) 8, 70 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 10 % (v/v) Glycerin, Sterilisation durch Autoklavieren; + 400 µl einer in 1 ml H_2O_{bidest} gelösten Proteinase Inhibitor *COMPLETE* Tablette (Roche, Mannheim)

1 x PBS-Puffer (1l):

8 g NaCl, 2 g KCl, 2,4 g KH_2PO_4, 36,9 g Na_2HPO_4 x 12 H_2O, pH 7,4; Sterilisation durch Autoklavieren

2 x DNA-Bindepuffer:

10 mM Tris, pH (HCl) 7,5, 1 mM EDTA, 2 M NaCl; Sterilisation durch Autoklavieren

Protein-Bindepuffer:

20 mM Tris, pH (HCl) 8, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 10 % (v/v) Glycerin, Sterilisation durch Autoklavieren; + 400 µl einer in 1 ml H_2O_{bidest} gelösten Proteinase Inhibitor *COMPLETE* Tablette (Roche, Mannheim), + 0,005 % (v/v) Triton-X-100

Elutionspuffer:

Wie Protein-Bindepuffer, wobei neun Puffer mit steigenden NaCl-Konzentrationen von 100-900 mM in 100 mM Schritten hergestellt wurden.

3.4.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Für die gelelektrophoretische Auftrennung der Proteine wurden SDS-Polyacrylamid-Gele verwendet (nach Laemmli, 1970; Schägger & von Jagow, 1987).

10%iges Trenngel mit Glycerin (Schägger & von Jagow, 1987)		Sammelgel:
3,3 ml	Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung (37,5 : 1)	0,8 ml
4,5 ml	Gelpuffer	2,6 ml
1,1 ml	50%iges (v/v) Glycerin	---
4,2 ml	H_2O_{bidest}	4,2 ml
135 µl	10%iges (w/v) APS	160 µl
15 µl	TEMED	15 µl

12,5%iges Trenngel (Laemmli, 1970)		Sammelgel:
4,15 ml	Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung (37,5 : 1)	0,835 ml
2,6 ml	Trenngelpuffer	---
---	Sammelgelpuffer	1,25 ml
3,21 ml	H_2O_{bidest}	2,87 ml
30 µl	10%iges (w/v) APS	30 µl
15 µl	TEMED	15 µl

Die Proteinproben wurden mit 5 x Probenauftragspuffer versetzt, bevor sie zur Denaturierung für 5 min bei 95°C (10%ige Gele) inkubiert wurden. Folgte eine Analyse mittels MALDI-ToF MS wurden lösliche Proteine für 15 min bei 60°C und 900 rpm (*TS 100 Thermoshaker*, peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen) inkubiert und Oberflächenproteine für 30 min bei Raumtemperatur und 1.000 rpm (TS 100 Thermoshaker, peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen). Anschließend erfolgte eine Gelelektrophorese. Diese wurde in einem *BlueVertical 101* Gerät (Serva *Electrophoresis* GmbH, Heidelberg) bei einer anfänglichen Spannung von 50 V durchgeführt. Die Spannung wurde auf 120 V erhöht, sobald die Proteine das Trenngel erreicht hatten. Als Laufpuffer für 10%ige-Gele dienten Kathoden- und Anodenpuffer, für 12%ige-Gele wurde 1 x SDS-Laufpuffer verwendet. Zur Größenbestimmung wurde ein Proteinmarker (peqGOLD Protein-Marker II oder V, peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen) mit auf das Gel aufgetragen. Anschließend wurden die Gele mit Coomassie *Brilliant Blue* gefärbt (vgl. Abschnitt 3.4.7).

Gelpuffer:

3 M Tris, 1 M HCl, 0,3 % (w/v) SDS; Sterilisation durch Autoklavieren

Trenngelpuffer:

1,5 M Tris, pH (HCl) 8,8, 0,4 % (w/v) SDS; Sterilisation durch Autoklavieren

Sammelgelpuffer:

0,5 M Tris, pH (HCl) 6,8, 0,4 % (w/v) SDS; Sterilisation durch Autoklavieren

5 x Probenauftragspuffer:

250 mM Tris, 20 % (w/v) SDS, 60 % (v/v) Glycerin, 10 % (v/v) *β*-Mercaptoethanol, 0,01 % (w/v) Servablau G-250, pH (HCl) 6,8

Kathodenpuffer:

0,2 M Tris, 0,1 M Tricine, 0,1 % (w/v) SDS; Sterilisation durch Autoklavieren

Anodenpuffer:

0,2 M Tris, pH (HCl) 8,9; Sterilisation durch Autoklavieren

1 x SDS-Laufpuffer:

50 mM Tris, pH (HCl) 8,5, 1,92 M Glycin, 1 % (w/v) SDS

3.4.6 2D-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (2D-PAGE)

In der zweidimensionalen SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese werden die Proteine zuerst nach ihrem isoelektrischen Punkt aufgetrennt (isoelektrische Fokussierung), sodass sich die Proteine entlang eines pH-Gradienten sammeln. Nach einer Äquilibrierung, bei der die Disulfidbrücken entfernt werden, folgt die Auftrennung nach ihrem Molekulargewicht mittels SDS-PAGE (siehe Abschnitt 3.4.5). 300 µg Proteine wurden in 450 µl Rehydratisierungslösung aufgenommen. Die Probenflüssigkeit wurde in der Rehydratisierungswanne (GE Healthcare, Freiburg) verteilt und der Gelstreifen (*Immobiline Dry Strip,* pH 3-10 bzw. 6-11, 18 cm, GE Healthcare, Freiburg) luftblasenfrei mit der Gelseite nach unten aufgelegt. Die Rehydratisierung des Gels erfolgte für 22-24 h bei Raumtemperatur. Anschließend folgte die isoelektrische Fokussierung der Proteine für 22 h bei 20°C in einem *IPGphor*^{TM} *Isoelectric Focussing* System (Amersham Biosciences, Freiburg). Die Gelstreifen wurden mit zwei in H_2O_{bidest} getränkten Filterstreifen und über Elektrodenbrücken mit den Elektroden des Systems verbunden und mit *PlusOne Dry Strip Cover Fluid* (Amersham Biosciences, Freiburg) überschichtet. Es wurde eine Spannung von 30 V für 12 h angelegt, 60 V für 2 h sowie 500 und 1.000 V für jeweils eine Stunde. Es folgte ein 12-stündiger Gradient bei 8.000 V. Nach der isoelektrischen Fokussierung wurden die Gelstreifen entweder sofort für die

zweite Dimension verwendet oder bei -20°C eingefroren. Es folgten zwei Inkubationsschritte für 15 min bei Raumtemperatur in Äquilibrierungslösung mit 1 % (w/v) DTT und mit 4 % (w/v) Iodacetamid und einigen Körnern Bromphenolblau. Nach dem Spülen mit H_2O_{bidest} wurden die Streifen auf 12,5%ige SDS-Gele aufgelegt. Die Gelelektrophorese erfolgte in 1 x SDS-Puffer bei einer konstanten Stromstärke von 15-20 mA/Gel für etwa 14-18 h (Ettan Dalt II, Amersham Biosciences, Freiburg). Anschließend wurden die Gele mit Coomassie *Brilliant Blue* gefärbt (vgl. Abschnitt 3.4.7).

12,5%iges Trenngel mit Glycerin (für 12 Gele)		Sammelgel:
163,2 ml	Bisacrylamid (2%ig (v/v))	4,5 ml
291,84 ml	Acrylamid (40%ig (v/v))	9 ml
240 ml	1 M Tris, pH (HCl) 8,8	---
---	1 M Tris, pH (HCl) 6,8	25 ml
9,6 ml	10%iges (v/v) SDS	1 ml
155,36 ml	H_2O_{bidest}	60 ml
2,4 ml	10%iges (w/v) APS	380 ml
480 µl	TEMED	64 µl

Rehydratisierungslösung:

6 M Harnstoff, 2 M Thioharnstoff, 4 % (w/v) CHAPS, 0,5 % (w/v) Pharmalyte™ pH 3-10 (GE Healthcare, Freiburg), 0,4 % (w/v) DTT, etwas Bromphenolblau

Äquilibrierungslösung:

50 mM Tris, 6 M Harnstoff, 30 % (v/v) Glycerin, 2 % (w/v) SDS, pH (HCl) 6,8

10 x SDS-Laufpuffer:

0,25 M Tris, 1 % (w/v) SDS, 2 M Glycin

3.4.7 Färbung mit Coomassie *Brilliant Blue*

Mittels SDS- (siehe Abschnitt 3.4.5) oder 2D-PAGE (siehe Abschnitt 3.4.6) aufgetrennte Proteine wurden nach der Gelelektrophorese mit Coomassie *Brilliant Blue* sichtbar gemacht (nach Sambrook *et al.*, 1989). Dazu wurden die Gele für 10-15 min bzw. 1 h in einer Färbelösung inkubiert. Die Entfärbung erfolgte für 2-4 h oder über Nacht in 10%iger (v/v) Essigsäure. Zur Lagerung wurden die Gele in Folie eingeschweißt und bei 4°C aufbewahrt.

Färbelösung:

45 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Essigsäure, 0,1 % (w/v) Coomassie *Brilliant Blue* G-250

3.4.8 Zymographie

Um die Protease-, Cellulase- und Pektinaseaktivität zu überprüfen, wurden die Bakterien von einer Übernacht-Kultur in 100 ml Minimalmedium überführt und 24 h oder 48 h (Proteaseaktivität) bzw. sechs Tage (Cellulase- und Pektinaseaktivität) kultiviert (siehe Abschnitt 3.2.3; nach Jahr *et al.*, 2000). Die Kultur wurde anschließend zentrifugiert (8.000 x g, 20 min, 4°C) und der Medienüberstand filtriert (*Minisart Filter*, Porengröße 20 µm, Sartorius AG, Göttingen). Die Proteine wurden für die Analyse der Proteaseaktivität mittels Amicon-Filter (Porengröße 0,22 µm, Ausschluss: <10 kDa, Merck Millipore, Massachusetts) ankonzentriert, für die Analyse der Cellulase- und Pektinaseaktivität wurde eine Ammoniumsulfatfällung durchgeführt (Jahr *et al.*, 2000). Die nach Dixon berechnete Menge an Ammoniumsulfat wurde nach und nach zu 50 ml Mediumüberstand gegeben, um eine Endkonzentration von 40 % (w/v) Ammoniumsulfat zu erhalten (Dixon, 1952). Nach einer Zentrifugation (8.000 x g, 20 min, 4°C) wurde das Pellet in 0,25-1 ml 50 mM Tris-HCl, pH 8,5 resuspendiert und die Proteinlösung für die folgende Zymographie eingesetzt. Noch gelöste Proteine des Überstands nach der Zentrifugation wurden erneut mit so viel Ammoniumsulfat versetzt, dass eine Endkonzentration von 60 % (w/v) Ammoniumsulfat erreicht wurde. Nach einer erneuten Zentrifugation wurde das Pellet in 50 mM Tris-HCl, pH 8,5 resuspendiert und die Proteinlösung für die folgende Zymographie eingesetzt.

Für die Durchführung der SDS-PAGE wurden dem 10%igen Trenngel (siehe Abschnitt 3.4.5) 0,2 % (w/v) Azocasein, 0,1 % (w/v) Carboxymethylcellulose oder 0,1 % (w/v) Pektin für die Bestimmung der Protease-, Cellulase- oder Pektinaseaktivität zugefügt. Die Durchführung erfolgte in Anlehnung an das Protokoll von Schneider und Kollegen (Schneider *et al.*, 2010). 18 µg Proteine wurden mit 5 x Probenauftragspuffer versetzt, anschließend jedoch nicht für 5 min bei 95°C inkubiert. Nach der Gelelektrophorese wurde das Gel zwei Mal für 15 min in 50 mM Tris, pH (HCl) 7,2 + 25 % (v/v) Isopropanol und anschließend zwei Mal für 15 min in 50 mM Tris, pH (HCl) 7,2 auf der Wippe (GFL mbH, Burgwedel) inkubiert. Es folgte eine Inkubation für 3 h bei 40°C. Für die Bestimmung der Proteaseaktivität wurde das Gel so lange in 1 M NaOH inkubiert, bis ungefärbte Banden auf dem orange gefärbten Gelhintergrund zu erkennen waren. Wenn nötig, wurde mit Coomassie *Brilliant Blue* gegengefärbt (siehe Abschnitt 3.4.7). Für die Bestimmung der Cellulaseaktivität wurde das Gel für 5 min in 0,5%iger (w/v) Congo Rot-Lösung gefärbt und in 1 M NaCl entfärbt, bis ungefärbte Banden gegen einen roten Hintergrund zu erkennen waren. Wenn nötig wurde mit Coomassie *Brilliant Blue* gegengefärbt (siehe Abschnitt 3.4.7). Die Pektinaseaktivität wurde durch die Zugabe von

0,05%iger (w/v) Rutheniumrot-Lösung, einer 10-minütigen Inkubation und dem anschließenden Entfärben in 1 M NaCl als ungefärbte Banden gegen einen violetten Hintergrund ermittelt.

5 x Probenauftragspuffer:
250 mM Tris, 20 % (w/v) SDS, 60 % (v/v) Glycerin, 10 % (v/v) *β*-Mercaptoethanol, 0,01 % (w/v) Servablau G-250, pH (HCl) 6,8

3.4.9 Vorbereitung der Proteine zur Analyse mittels MALDI-ToF MS

Zur Analyse von Oberflächenproteinen sowie extrazellulären und zytoplasmatischen Proteinen mittels MALDI-ToF Massenspektrometrie wurden 30 µg Proteine bzw. 30 µl Proteinlösung (siehe Abschnitt 3.4.4.1 und 3.4.4.2) auf ein SDS-Gel (siehe Abschnitt 3.4.5) aufgetragen. Kurz nach Eintritt der Proteine in das Trenngel wurde die Elektrophorese abgebrochen und das Gel wurde ge- und entfärbt (siehe Abschnitt 3.4.7). Die noch kaum aufgetrennten Proteine wurden als Gelblock ausgeschnitten, in Rektionsgefäße überführt und mittels MALDI-ToF MS analysiert (Ruhr-Universität, Bochum). Zur Analyse von Regulatoren wurden die Elutionsfraktionen der Bindungsexperimente (Abschnitt 3.4.4.3) auf ein SDS-Gel (siehe Abschnitt 3.4.5) aufgetragen. Die zu analysierenden Proteinbanden wurden markiert und das gesamte SDS-Gel nach Greifswald gesendet (Ernst-Moritz-Arndt Universität, Greifswald). Die Analyse erfolgte dort ebenfalls mittels MALDI-ToF MS.

3.4.10 Protein-Hybridisierung (*Western Blot)*

Für den Nachweis von GFP im Proteinextrakt einer Bakterienkultur wurde eine *Western Blot*-Analyse durchgeführt. Nach der Auftrennung der Proteine mittels SDS-PAGE (siehe Abschnitt 3.4.5) wurden diese auf eine PVDF-Membran (Millipore Immobilon P, Roth, Karlsruhe) transferiert. Dazu wurde die Membran kurz in 60%igem (v/v) Methanol und in Transferpuffer inkubiert und auf in Transferpuffer-getränkte Filterpapiere (Schleicher & Schuell, Dassel) in eine *semi dry* Blot-Apparatur (Amersham Biosciences, USA) gelegt. Darauf wurden das Proteingel und weitere getränkte Filterpapiere gelegt. Der Proteintransfer auf die Membran erfolgte für 1 h bei 0,8 mA/cm^2. Anschließend wurde die Membran für 5 min in 1 x PBS/T Puffer und danach für eine Stunde in Blockierungslösung auf der Wippe (GFL mbH, Burgwedel) inkubiert. Nach der Zugabe des GFP-spezifischen Antikörpers (anti-GFP, Roche, Mannheim, in der Maus generiert) in einer Konzentration von 1:10.000 wurde die Membran über Nacht auf der Wippe inkubiert. Darauf folgten drei fünfminütige Waschschritte in 1 x PBS/T-Puffer und eine Inkubation für 1 h in Blockierungslösung mit einem sekundären Antikörper, an den eine alkalische Phosphatase gekoppelt war (1:10.000, Anti-Maus, Sigma-

Aldrich, Steinheim). Die Membran wurde anschließend wiederum drei Mal für 5 min in 1 x PBS/T-Puffer gewaschen. Für die Detektion des Signals wurden BCIP und NPT (Roth, Karlsruhe) verwendet, welche als Substrate für die alkalische Phosphatase dienten. Dafür wurden je 65 µl einer BCIP- und NBT-Stammlösung in 10 ml Inkubationspuffer verdünnt und auf die Membran gegeben. Die Membran wurde bis zur gewünschten Signalstärke im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von Stopplösung beendet. Anschließend wurde die Membran zwischen Filterpapieren (Schleicher & Schuell, Dassel) getrocknet.

Transferpuffer:
25 mM Tris, 0,2 M Glycin, 20 % (v/v) Methanol, pH (HCl) 8,5

1 x PBS-Puffer (1l):
8 g NaCl, 2 g KCl, 2,4 g KH_2PO_4, 36,9 g Na_2HPO_4 x 12 H_2O, pH 7,4; Sterilisation durch Autoklavieren

1 x PBS/T-Puffer:
1 x PBS-Puffer mit 0,1 % (v/v) Tween 20® (steril)

Blockierungslösung:
5 % (w/v) Magermilchpulver in 1 x PBS

BCIP-Stammlösung:
0,5 g 5-Brom-4-Chlor-3-indolylphosphat Toluidin Salz (BCIP) wurden in 20 ml 100%igem (v/v) Dimethylformamid gelöst und bei -20°C gelagert

NBT-Stammlösung:
0,5 g Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (NBT) wurden in 10 ml 70%igem (v/v) Dimethylformamid gelöst und bei -20°C gelagert

Inkubationspuffer:
100 mM Tris pH (HCl) 9,5, 100 mM NaCl, 5 mM $MgCl_2$

Stopplösung:
0,5 M EDTA in 1 x PBS; Sterilisation durch Autoklavieren

3.5 Techniken zur Manipulation von Bakterien

3.5.1 Herstellung kompetenter *E. coli* DH5αMCR

Chemisch kompetente *E. coli* DH5αMCR wurden nach der Methode von Sambrook und Kollegen durch Behandlung mit $CaCl_2$ hergestellt (Sambrook *et al.*, 1989). Die Kultivierung erfolgte wie in Abschnitt 3.2.2 aufgeführt. Mit der Übernacht-Kultur wurden 100 ml LB-Medium auf eine oD_{600} von 0,1 eingestellt. Bei einer oD_{600} von 0,4-0,6 wurden die Bakterien zentrifugiert (4.000 x g, 10 min, 4°C), in 40 ml kaltem 50 mM $CaCl_2$ resuspendiert und 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (4.000 x g, 10 min, 4°C) wurde das Pellet in 5 ml kaltem 50 mM $CaCl_2$ resuspendiert und die Suspension wurde für 10 min auf Eis inkubiert. Nach der Zugabe von 1,3 ml kaltem 87%igem (v/v) Glycerin wurden die kompetenten Bakterien in 100 µl Portionen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

3.5.2 Transformation kompetenter *E. coli* DH5αMCR

Zur Transformation wurden 100 µl kompetente *E. coli* DH5αMCR (siehe Abschnitt 3.5.1) auf Eis aufgetaut und entweder mit dem kompletten Ligationsansatz (siehe Abschnitt 3.3.1.6) oder mit 1-2 µl Plasmid-DNA (siehe Abschnitt 3.3.1.1) versetzt. Die Bakterien wurden für 30 min auf Eis inkubiert. Die Aufnahme der Plasmid-DNA erfolgte während eines Hitzeschocks für 1 min bei 42°C, woraufhin die Bakterien sofort für 5 min auf Eis inkubiert wurden. Nach der Zugabe von 1 ml LB-Medium wurde der Ansatz für eine Stunde bei 37°C und 600 rpm im *TS 100 Thermoshaker* (peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen) geschüttelt. Die Bakterien wurden für 3 min bei 5.000 x g und Raumtemperatur pelletiert, im Rücklauf resuspendiert und auf LB-Platten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert. Die Platten wurden für 24 h bei 37°C inkubiert.

3.5.3 Herstellung kompetenter *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*

Die Herstellung kompetenter *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* erfolgte in Anlehnung an das Protokoll von Kirchner und Kollegen (Kirchner *et al.*, 2001). Die Bakterien wurden wie in Abschnitt 3.2.3 beschrieben kultiviert. Anschließend wurden 218 ml TBY-Medium mit der Übernacht-Kultur auf eine oD_{580} von 0,2 angeimpft und bei 26°C inkubiert, bis eine oD_{580} von 0,6 erreicht wurde. Alle weiteren Schritte wurden wie von Kirchner und Kollegen beschrieben durchgeführt (Kirchner *et al.*, 2001). Nach der Zugabe von 1 ml 15%igem (v/v) Glycerin wurden die kompetenten Bakterien in 100 µl-Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

3.5.4 Transformation kompetenter *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*

Die Transformation kompetenter *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* erfolgte gemäß Kirchner und Kollegen (Kirchner *et al.*, 2001). Die Bakterien wurden auf Eis aufgetaut. Anschließend wurden 2,5 µg DNA zugefügt und die Transformation erfolgte mittels Elektroporation durch einen *Gene-Pulser* (Biorad, München) bei 2,5 kV, 600 Ω und 25 µF. Die dreistündige Inkubation erfolgte bei 26°C und 600 rpm im *TS 100 Thermoshaker* (peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen), woraufhin die Bakterien zentrifugiert (5.000 x g, 3 min), im Rücklauf resuspendiert und auf TBY-Platten mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert wurden. Die Platten wurden für zwei bis drei Tage bei 28°C inkubiert. Entstandene Kolonien wurden nochmals auf TBY-Antibiotikaplatten ausgestrichen und weitere ein bis zwei Tage bei 28°C inkubiert. Je acht Stämmen pro Elektroporation wurden mittels Kolonie-PCR auf das Vorhandensein von pCM1 und pCM2 geprüft (siehe Abschnitt 3.3.1.3).

3.5.5 Insertionsmutagenese in *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*

Für die Herstellung von Insertionsmutanten wurden kompetente *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*-Stämme (siehe Abschnitt 3.5.3) mit dem Plasmid pUC18*cat*, welches homologe Sequenzen des Zielgens beinhaltete (Tabelle 3), transformiert (siehe Abschnitt 3.5.4). Die transformierten Stämme wurden auf TBY-Platten mit 10 µg/ml Chloramphenicol ausplattiert. Aus den Stämmen, die sowohl pCM1 als auch pCM2 besaßen und auf den Platten mit Chloramphenicol wachsen konnten, wurde die chromosomale DNA isoliert und diese in DNA-Hybridisierungsexperimenten (siehe Abschnitt 3.3.1.9) analysiert. Die Insertion erfolgte nach homologer Rekombination, wobei das gesamte Plasmid, das in der Bakterienzelle nicht repliziert werden kann, in den offenen Leserahmen des Zielgens eingefügt wurde. Die spezifische DNA-Sonde und die Restriktionsenzyme für den *Southern Blot* wurden so gewählt, dass nach Vergleich mit der DNA des Wildtyps auf eine Insertion im Zielgen geschlossen werden konnte.

3.5.6 Fluoreszenzmessung

Für die Herstellung von GFP-Reportergen-Stämmen wurde das promotorlose Gen *gfpuv* aus pEPR1P45*gfp* in den *E. coli* / *Clavibacter Shuttle* Vektor pDM302 kloniert, wobei das Gen *cat*, welches für eine Chloramphenicol-Resistenz verantwortlich ist, ersetzt wurde (Tabelle 3 und Tabelle 4). Verschiedene putative Promotorregionen aus *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* wurden ebenfalls eingefügt. Kompetente *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*-Stämme (siehe Abschnitt 3.5.3) wurden mit den entsprechenden Plasmiden mittels Elektroporation transformiert (siehe Abschnitt 3.5.4). Die entstandenen *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*-Stämme (Tabelle 2), welche durch die

Elektroporation das natürliche Plasmid pCM1 verloren hatten, wurden wie in Abschnitt 3.2.3 beschrieben kultiviert. Nach einem Zentrifugationsschritt (5.400 x g, 10 min, 4°C) wurden die Bakterien entweder in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -20°C gelagert, oder direkt in 1 x PBS gewaschen (5.400 x g, 10 min, 4°C). 10 ml 1 x PBS wurden daraufhin mit der in wenig 1 x PBS aufgenommenen Bakteriensuspension auf eine oD_{580} von 0,5 eingestellt. Es wurden jeweils zwei Mal 2 ml Probe vermessen.

Nachdem die Probe mit Licht der Wellenlänge 395 nm angeregt wurde, wurde die Licht-Emission zwischen 500 und 515 nm mittels Fluorimeter *Fluorolog 3 Double Spectrometer* (Spex, Edison, USA) detektiert. Die relativen Fluoreszenz-Einheiten (RFU) wurden abhängig von der oD_{580}, der Lichtemission bei 508 nm und dem Trockengewicht der Bakterien bestimmt (Giannona, 2003).

1 x PBS-Puffer (1l):

8 g NaCl, 2 g KCl, 2,4 g KH_2PO_4, 36,9 g Na_2HPO_4 x 12 H_2O, pH 7,4; Sterilisation durch Autoklavieren

4 Ergebnisse

In dieser Arbeit wurde die Interaktion zwischen dem Gram-positiven pflanzenpathogenen Bakterium *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* und der Wirtspflanze *S. lycopersicum* (Tomate) untersucht. Dabei erfolgte eine phänotypische Analyse der Krankheitssymptome in der Pflanze nach einer bakteriellen Infektion der Wurzeln, des Stängels oder der Samen. Die Analyse wurde ebenfalls auf molekularer Ebene durchgeführt, wobei zum einen das Proteom und zum anderen das Transkriptom untersucht wurde. Dabei wurde die Analyse in einem in dieser Arbeit etablierten synthetischen Medium durchgeführt, welches die Bedingungen des Xylemsaftes, dem natürlichen Lebensraum der Bakterien, imitiert. Mit Hilfe von MALDI-ToF Massenspektrometrie- und Microarray-Experimenten wurden dabei mögliche Virulenzfaktoren identifiziert. Auf DNA-Ebene wurden Promotorstudien durchgeführt, um ein *Clavibacter*-typische Konsensus-Motiv der -10-, der -35-Region sowie der Shine-Dalgarno-Sequenz zu etablieren. Neben der Wirt-Pathogen-Interaktion wurde außerdem die Interaktion von *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* mit der Nicht-Wirts-Pflanze *Nicotiana* (Tabak) analysiert.

4.1 Wachstumsverhalten von *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*

Zu Beginn dieser Arbeit wurde das Wachstumsverhalten von *C. michiganensis* subsp. *michiganensis in vitro* unter den gegebenen Laborbedingungen getestet. Als Wildtypstamm wurde der Stamm NCPPB382 verwendet, der im weiteren Verlauf mit *Cmm*382 abgekürzt wird. Das Wachstum von *Cmm*382 wurde im Schüttelkolben über einen Zeitraum von 53 h analysiert. Dafür wurden 50 ml Vollmedium (TBY) bzw. Minimalmedium (M9) mit einer *Cmm*382-Übernacht-Kultur auf eine optische Dichte von 0,1 bei 580 nm (oD_{580}) angeimpft. Die oD_{580} wurde alle 2-4 h gemessen (Abbildung 6). In TBY-Medium wurde nach 28 h mit 3,95 die End-oD_{580} erreicht, in M9-Medium nach 53 h (oD580 = 1,33). Die Generationszeiten betrugen in TBY-Medium 2,9 h ± 0,2 h und in M9-Medium 12,28 h ± 0,6 h. Eine oD_{580} von 0,1 entspricht etwa einer Bakteriendichte von 10^8 cfu/ml (*colony forming units*: cfu) (Engemann, 2006). In TBY-Medium wurde dementsprechend eine Dichte von 3,95 x 10^9 cfu/ml erreicht, in M9-Medium eine von 1,33 x 10^9 cfu/ml. Die höchste Bakteriendichte, die in der Pflanze neun Tage nach der Infektion mit *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* erreicht wird, beträgt 1 x 10^9 cfu/ml (Meletzus *et al.*, 1993).

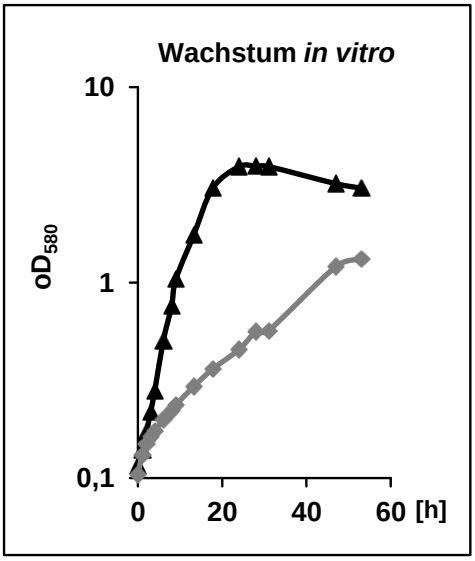


Abbildung 6: Wachstum von *Cmm*38 in Voll- (TBY) und Minimalmedium (M9). In TBY-Medium (schwarze Dreiecke) wurde nach 28 h mit 3,95 die End-oD_{580} erreicht. Die Generationszeit betrug 2,9 h ± 0,2 h. Die End-oD_{580} in M9-Medium (graue Rauten) betrug 1,33 und die Generationszeit 12,28 h ± 0,6 h. In der Pflanze wird neun Tage nach der Infektion eine Bakteriendichte von 1 x 10^9 cfu/g erreicht (Meletzus *et al.*, 1993). Mit dem Erreichen der höchsten oD_{580} *in vitro*, lag die Bakteriendichte in TBY-Medium bei 3,95 x 10^9 cfu/ml und in M9-Medium bei 1,33 x 10^9 cfu/ml.

4.2 Infektion von Tabakpflanzen

Nicotiana-Arten (Tabak) und *M. jalapa* (Wunderblume) sind resistent gegenüber einer Infektion mit *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*. Als Abwehrreaktion der Pflanze kommt es nach der bakteriellen Infektion zu einem lokalen Pflanzenzelltod am Ort der Infektion. Der zugrunde liegende Mechanismus wird als hypersensitive Antwort (*hypersensitive response:* HR) bezeichnet (Gitaitis, 1990; Alarcón *et al.*, 1998). Die inkompatible (nicht-erfolgreiche) Interaktion zwischen *Nicotiana*-Arten und *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* wurde in dieser Arbeit phänotypisch und auf molekularer Ebene analysiert.

4.2.1 Phänotypische Analyse der *Nicotiana*-Infektion

Die Blätter der zwei Tabakarten *N. benthamiana* und *N. tabacum* cv. Samsun NN wurden entweder komplett oder teilweise mit den Bakteriensuspensionen (oD_{580} = 4) des Wildtypstammes *Cmm*382 und des plasmidfreien Stammes *Cmm*100 sowie zur Kontrolle mit 10 mM $MgCl_2$ behandelt. Zwei Tage nach der Infektion (*days post infection:* dpi) mit Bakterien zeigte sich eine Farbveränderung des Blattgewebes von *N. tabacum* (Abbildung 7, A). Neben chlorotischem Gewebe war zum Teil lokaler Zelltod in Form einer Nekrose zu erkennen. In *N. benthamiana*-Blättern war 2 dpi kein Unterschied zur Kontrolle sichtbar (Daten nicht gezeigt). 8 dpi zeigten die mit *Cmm*100 und *Cmm*382 infiltrierten *N. tabacum*-Blätter eine

deutliche Nekrose (Abbildung 7, B, Mitte und rechts). *N. benthamiana*-Blätter zeigten nach der Infektion mit *Cmm*100 lediglich chlorotisches Gewebe, nach der Infektion mit *Cmm*382 war eine deutliche Nekrose zu erkennen (Abbildung 7, C).

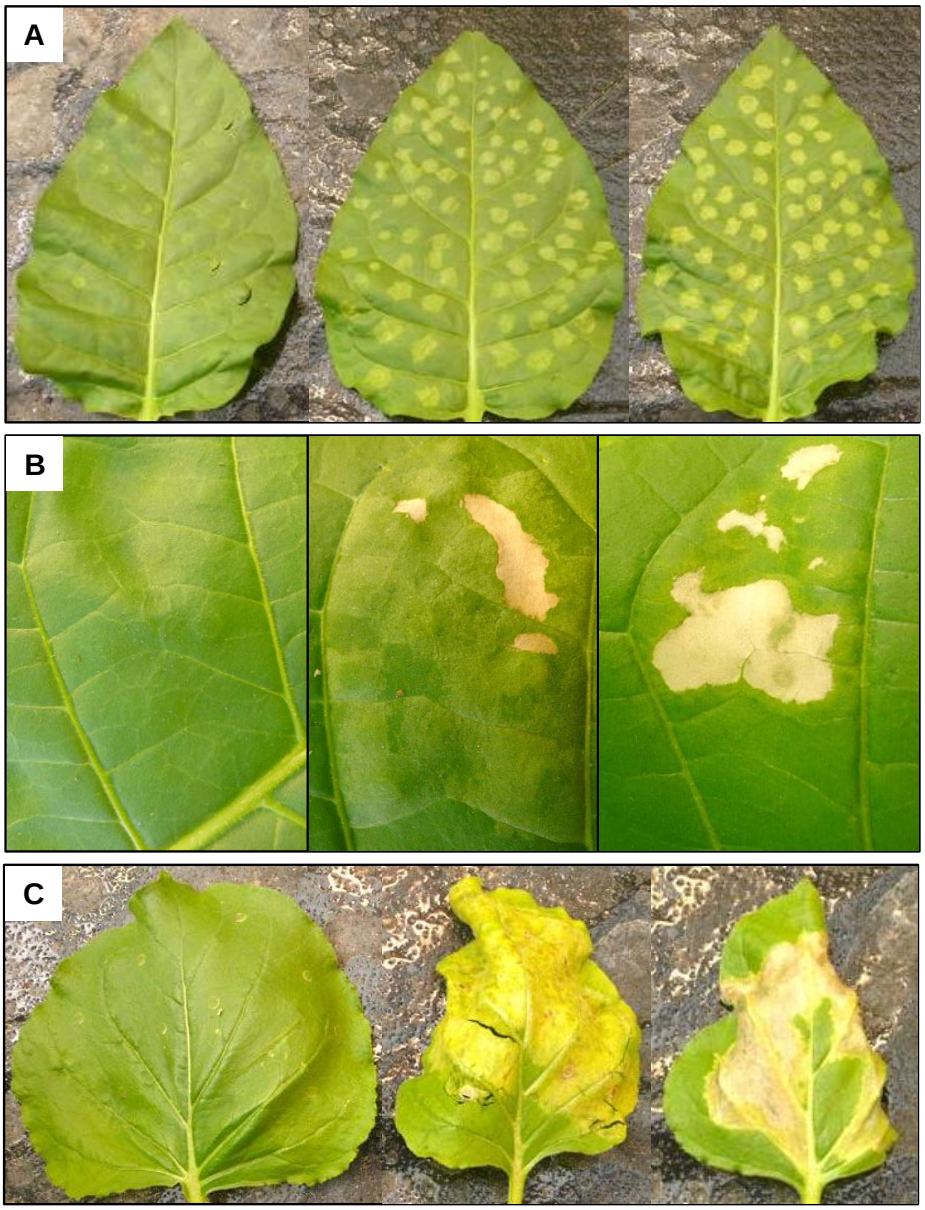


Abbildung 7: *Nicotiana*-Blätter nach der Infiltration von *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*. Von links nach rechts: 10 mM $MgCl_2$, *Cmm*100 und *Cmm*382. *N. tabacum*-Blätter, **A:** 2 dpi und **B:** 8 dpi. Nekrotisches Gewebe war nach der bakteriellen Infektion zu erkennen, zum Teil auch schon nach zwei Tagen. **C:** *N. benthamiana*-Blätter, die acht Tage nach der Infektion mit *Cmm*100 Chlorose (Mitte) und mit *Cmm*382 Nekrose (rechts) zeigten.

Da der Zelltod in *N. tabacum*-Blättern schneller zu erkennen war, wurde für nachfolgende Experimente diese Tabakart gewählt. Ob die Ausbildung nekrotischen Gewebes durch eine HR hervorgerufen wurde, wurde auf molekularer Ebene analysiert.

4.2.2 Molekulare Analyse der *Nicotiana*-Infektion

Für die Ausbildung einer Resistenz gegenüber Pathogenen wurden einige pflanzliche Proteine identifiziert, die bei der Entstehung einer HR eine Rolle spielen. In Tabakpflanzen wird die Expression der beiden Gene *hsr201* und *hsr203J* (*hypersensitivity related*: *hsr*) nach der Infektion mit *P. solanacearum* im Zuge der HR induziert (Pontier *et al.*, 1994; Czernic *et al.*, 1996). Die bei einer HR ablaufenden Reaktionen führen dazu, dass das bakterielle Wachstum und die Ausbreitung der Bakterien inhibiert wird (Pontier *et al.*, 1998). Eine Analyse der bei einer Interaktion von *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* mit Tabakpflanzen beteiligten pflanzlichen *hsr*-Gene wurde bis jetzt nicht durchgeführt. In dieser Arbeit wurden Tabakblätter mit dem Wildtypstamm *Cmm*382 und dem plasmidfreien Stamm *Cmm*100 infiltriert. Anschließend wurde zum einen das Expressionsniveau der beiden HR-Gene *hsr201* und *hsr203J* in bakteriell- und $MgCl_2$-behandelten Tabakblättern mittels quantitativer *real-time* PCR (qPCR) ermittelt. Zum anderen wurde die Bakteriendichte in den Blättern zu unterschiedlichen Zeitpunkten bestimmt, um zu überprüfen, ob das bakterielle Wachstum inhibiert wurde.

Für die Durchführung von qPCR-Experimenten zur quantitativen Überprüfung der Transkriptmenge von *hsr201* und *hsr203J* wurden Tabakblätter mit *Cmm*382 und *Cmm*100 infiltriert. 0, 24 und 48 h nach der Infektion wurde die RNA aus je etwa 150 mg infiziertem Blattmaterial isoliert. Nach der Bestimmung von Reinheit und Qualität der RNA mittels Konzentrationsmessung und Gelelektrophorese, wurden qPCR-Experimente durchgeführt. Dabei wurde die mRNA in cDNA umgeschrieben und anschließend das Zielgen in einer PCR-Reaktion amplifiziert. Der im Reaktionsansatz enthaltene Farbstoff SYBR-Green® bindet nur an doppelsträngige Nukleinsäuren, deren Menge mit steigenden Amplifikationszyklen zunimmt. Die Fluoreszenz steigt somit mit zunehmender Zyklenzahl. Ab dem Überschreiten der Hintergrundfluoreszenz (C_q-Wert) können Aussagen über die Quantität der RNA getroffen werden. Je schneller die Hintergrundfluoreszenz überschritten wird, desto größer war die mRNA-Ausgangsmenge (Pfaffl, 2001).
Als Zielgene wurden in dieser Arbeit das Gen für die 18S rRNA als Kontrolle sowie *hsr203J* und *hsr201* verwendet. Um die Effizienz der PCR zu überprüfen und die einzusetzende RNA-Menge zu bestimmen, wurde die qPCR zuerst mit einer RNA-Verdünnungsreihe durchgeführt. Von der RNA aus 10 mM $MgCl_2$-behandelten Blättern wurden 100, 10, 1, 0,1 und 0,01 ng in Duplikaten eingesetzt. Nach dem Umschreiben der mRNA in cDNA erfolgte eine PCR-Reaktion mit den *Primern* für das 18S rRNA-Gen sowie für die Gene *hsr201* und *hsr203J*. Die Effizienz der PCR mit den *hsr201-Primern* lag auch bei mehrmaliger Durchführung des Experiments deutlich außerhalb des vorgegebenen Bereichs zwischen 90 und 105 % (*Real-Time* PCR *Applications Guide*, Biorad, München; Daten nicht gezeigt).

hsr201 wurde deshalb nicht weiter verwendet. Die Effizienz der PCR mit den 18S rRNA-*Primern* lag bei 96,6 % (Daten nicht gezeigt), für *hsr203J* betrug sie 108,8 % (Abbildung 8, A).

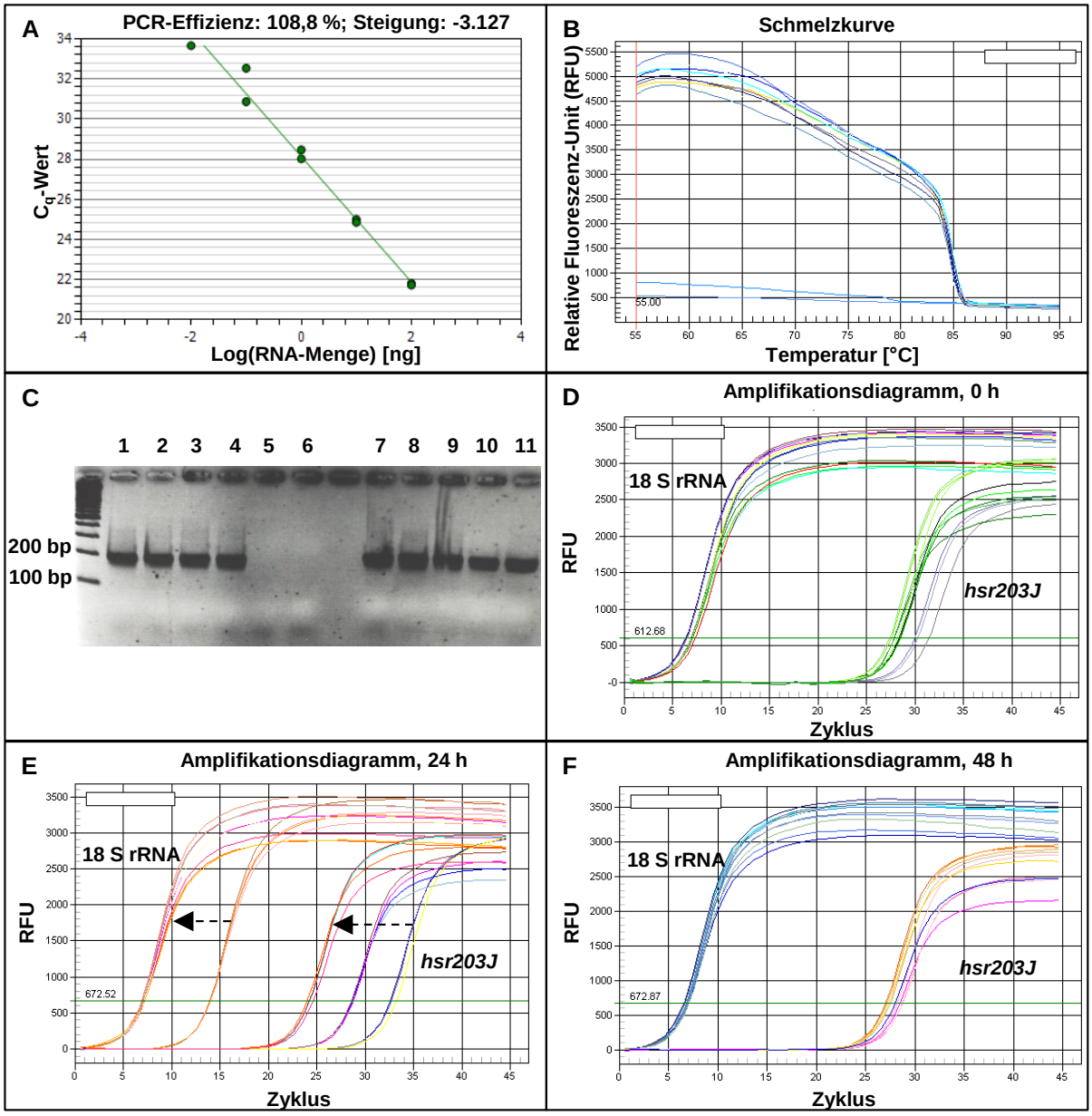


Abbildung 8: qPCR-Experiment mit der 18S rRNA (Kontrolle) und *hsr203J* (Zielgen). A: Standardgerade zur Bestimmung der PCR-Effizienz von *hsr203J*. In Duplikaten wurden in einer Verdünnungsreihe 100, 10, 1, 0,1 und 0,01 ng RNA eingesetzt. Die C_q-Werte repräsentieren den PCR-Zyklus, bei dem die Fluoreszenz das erste Mal über den Hintergrundwert steigt. **B** und **C:** Überprüfung der PCR-Reaktion mittels Schmelzkurve und Gelelektrophorese. Spuren 1-5 und 8-12: RNA-Mengen von 100-0,01 ng; Spur 6: Wasserprobe. **D-E:** PCR-Amplifikationsdiagramme, 0, 24 und 48 h nach der Infektion. In Triplikaten wurden je 10 ng RNA aus den 10 mM $MgCl_2$-, *Cmm*100- und *Cmm*382-behandelten Blättern eingesetzt. Die PCR von *Cmm*100_24 h (Pfeile) wurde wiederholt und zeigte dort mit 7 Zyklen einen zu *Cmm*382_24 h vergleichbaren C_q-Wert der 18 S rRNA (Daten nicht gezeigt). Der C_q-Wert von *hsr203J* war bei der Wiederholung ebenfalls vergleichbar mit *Cmm*382_24 h, wobei ebenso Unterschiede in den C_q-Werten der 18 S rRNA und von *hsr203J* der $MgCl_2$-behandelten Blätter zu erkennen waren.

Die Qualität der PCR-Produkte wurde zum einen über eine Schmelzkurve untersucht (Abbildung 8, B), zum anderen mittels Gelelektrophorese (Abbildung 8, C). Nach der PCR mit 0,01 ng RNA und in der Wasserkontrolle wurde kein amplifiziertes PCR-Produkt auf dem Gel nachgewiesen (Abbildung 8, C, Spuren 5 und 6).

Um die RNA-Menge von *hsr203J* in $MgCl_2$- und bakteriell-behandelten Blättern zu vergleichen, wurde erneut eine qPCR durchgeführt. Dazu wurde Blattmaterial 0, 24 und 48 h nach der Infiltration mit 10 mM $MgCl_2$, *Cmm*100 und *Cmm*382 verwendet. Für die qPCR-Reaktion wurden je 10 ng RNA in Triplikaten eingesetzt. In den Amplifikationsdiagrammen (Abbildung 8, D-F) wurde die relative Fluoreszenzeinheit (RFU) gegen den entsprechenden PCR-Zyklus aufgetragen. Die jeweils linken Kurven repräsentierten dabei die Amplifikation des 18S rRNA-Gens. Der C_q-Wert lag bei allen Bedingungen im sechsten oder siebten Zyklus. Eine Ausnahme bildete die RNA aus den Blättern 24 h nach der Infektion mit *Cmm*100 (Abbildung 8, E; gestrichelter Pfeil). Bei einer Wiederholung der qPCR lag der C_q-Wert jedoch ebenfalls im siebten Zyklus (Daten nicht gezeigt). Die rechten Kurven der Amplifikationsdiagramme repräsentierten die PCR mit *hsr203J*. Der C_q-Wert lag dabei etwa 20 PCR-Zyklen höher als für das 18S rRNA-Gen. 0 und 48 h nach der Infektion war nur ein geringer oder kein Unterschied zwischen der Menge an *hsr203J*-RNA in den 10 mM $MgCl_2$- und bakteriell-behandelten Blättern zu erkennen (Abbildung 8, D und F). 24 h nach der Infektion lag der C_q-Wert von *Cmm*382_*hsr203J* etwa vier Zyklen niedriger als der von $MgCl_2$_ *hsr203J*. Der C_q-Wert von *Cmm*100_*hsr203J* lag in diesem Experiment vier Zyklen höher als die Kontrolle. Bei wiederholter Durchführung war der C_q-Wert jedoch vergleichbar mit *Cmm*382_*hsr203J* (Daten nicht gezeigt).

Aus den Effizienzen und den C_q-Werten von Kontrollgen (18S rRNA-Gen) und Zielgen (*hsr203J*) der Kontrolle ($MgCl_2$-behandelte Blätter) und der Probe (bakteriell-infizierte Blätter) wurde das Verhältnis der relativen Genexpression von *hsr203J* zum 18S rRNA-Gen ermittelt (Abbildung 9; Pfaffl, 2001). Die berechnete Ausgangsmenge in 10 mM $MgCl_2$-behandelten Blättern wurde auf den Wert 1 gesetzt, alle weiteren Werte bezogen sich darauf. Direkt nach der Infektion (0 h) war die Transkriptmenge von *hsr203J* in *Cmm*382-infizierten Blättern sechs Mal höher, 24 h nach der Infektion 25 Mal höher als in den Kontrollpflanzen. Die *hsr203J*-Transkriptmenge in *Cmm*100-infizierten Blättern war elf Mal höher als in Kontrollpflanzen (Abbildung 9, A). Die Transkriptmenge des HR-spezifischen Gens *hsr203J* nahm somit direkt nach der Infektion mit *Cmm*382 bis etwa 24 h nach der Infektion stark zu. 48 h nach der Infektion wurde etwa das mRNA-Level zum Zeitpunkt der Infektion erreicht. Die Transkriptmenge von *hsr203J* nach der Infektion mit *Cmm*100 stieg ebenfalls bis 24 h nach der Infektion an. Es wurde jedoch nur etwa die Hälfte des maximalen Niveaus der *Cmm*382-infizierten Blätter erreicht.

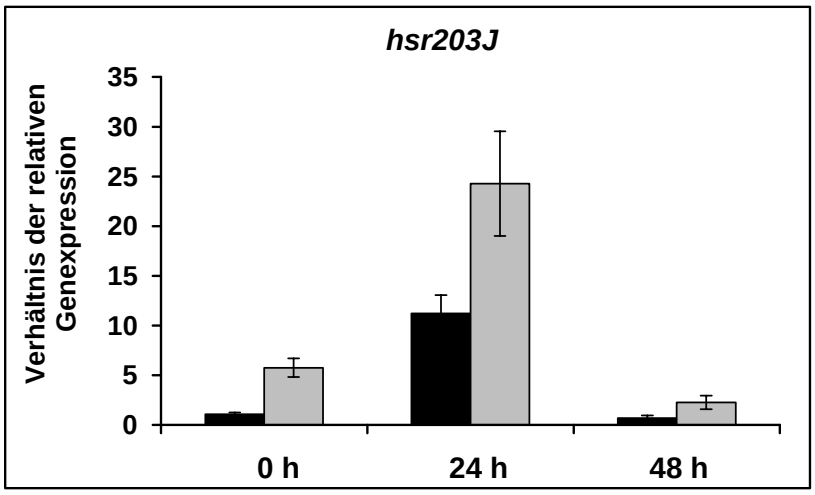


Abbildung 9: Quantitative Analyse der Tabakinfektion. A: Verhältnis der relativen Genexpression von *hsr203J* in bakteriell- und 10 mM $MgCl_2$-behandelten Blättern, 0, 24 und 48 h nach der Infektion. 24 h nach der bakteriellen Infektion lag die Transkriptmenge von *hsr203J* in *Cmm*100-infizierten Blättern elf Mal höher als zu Beginn der Infektion, in *Cmm*382-infizierten Blättern lag die Transkriptmenge 25 Mal höher. Schwarze Balken: mit *Cmm*100-infizierte Blätter, graue Balken: mit *Cmm*382-infizierte Blätter.

Die Infektion von Tabakblättern mit dem Wildtypstamm *Cmm*382 oder dem plasmidfreien Stamm *Cmm*100 löste somit eine Steigerung der Transkriptmenge des HR-spezifischen Gens *hsr203J* aus. Das deutet darauf hin, dass durch die Infektion mit *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* eine hypersensitive Antwort ausgelöst wurde.

Eine Abwehrreaktion der Pflanze gegenüber einer Infektion ist die Inhibierung des bakteriellen Wachstums. Um die Bakteriendichte von *Cmm*100 und *Cmm*382 in Tabakblättern nach der Infektion zu bestimmen, wurden Tabakblätter mit den Bakteriensuspensionen (oD_{580} = 0,1) infiltriert. 0, 24, 48 und 72 h nach der Infektion wurden in Triplikaten 150 mg Blattmaterial in flüssigem Stickstoff gefroren, homogenisiert und in 10 mM K_2HPO_4-Puffer aufgenommen, um die Bakterien aus den Blättern zu isolieren. Je 100 µl einer 1:1.000-Verdünnung wurden auf M9-Medium-Platten ausgestrichen und für zwei bis vier Tage bei 28°C inkubiert. Aus der Kolonienzahl wurde die cfu/mg Blattmaterial bestimmt (Abbildung 10, A). Der Bakterientiter in Tabakblättern lag 0, 24 und 72 h nach der Infektion jeweils bei etwa 1×10^9 cfu/mg bzw. 2×10^9 cfu/mg Blattmaterial. Aufgrund der hohen Standardabweichung kann keine Aussage über einen statistisch signifikanten Anstieg der Bakterienzahl getroffen werden. Die hohen Standardabweichungen waren vor allem darauf zurückzuführen, dass die Bakteriendichte kurz nach der Infektion (0 h) in den drei Replikaten zum Teil um den Faktor 20 schwankte (Daten nicht gezeigt). Aus diesem Grund wurde eine weitere Auswertung der Daten durchgeführt, in dem die absolute Bakterienzahl kurz nach der Infektion (0 h) auf 100 % gesetzt wurde und alle anderen Werte auf diesen Wert bezogen wurden (Abbildung

10, B). Es traten immer noch große Schwankungen auf, tendenziell war jedoch ein Anstieg der Bakteriendichte bis 72 h nach der Infektion zu erkennen. Aussagen über einen statistisch signifikanten Anstieg konnten aber ebenfalls nicht getroffen werden.

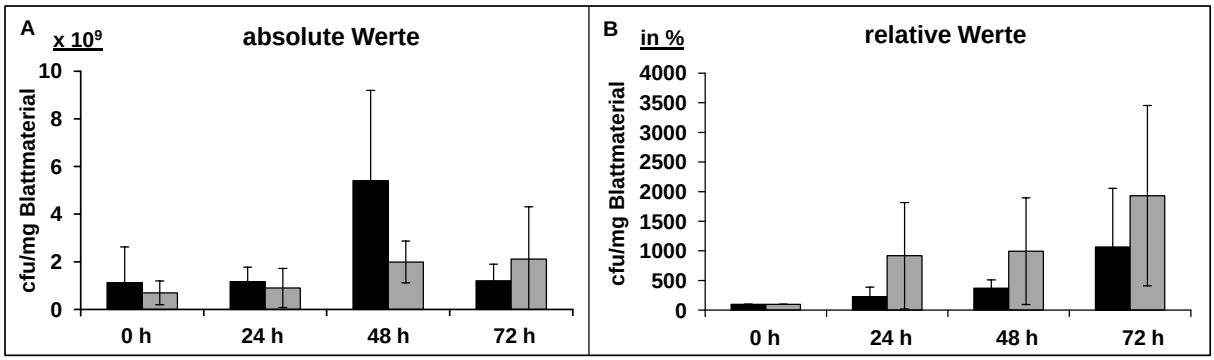


Abbildung 10: Bakterientiter-Bestimmung in Tabakblättern, 0, 24, 48 und 72 h nach der Infektion. A: Bakterientiter in absoluten Zahlen, **B:** Bakterientiter in relativen Zahlen, wobei der Wert zum Zeitpunkt der Infektion (0 h) gleich 100 % gesetzt wurde. Schwarze Balken: Infektion mit *Cmm*382, graue Balken: Infektion mit *Cmm*100.

4.3 Infektion von Tomatenpflanzen

Tomatenpflanzen sind suszeptibel gegenüber einer Infektion mit *Cmm*382, sodass es zur Ausbildung von Krankheitssymptomen in der Pflanze kommt. Die Bakterien dringen dabei über eine Verwundung des Stängels oder der Wurzeln sowie über natürliche Öffnungen in die Pflanze ein. Bisherige Infektionsversuche von Tomatenpflanzen mit Bakterien wurden vor allem über eine Verwundung des Stängels (Petiolusinfektion) durchgeführt (Bermphol *et al.*, 1996; Balaji *et al.*, 2008; Chalupowicz *et al.*, 2010; Chalupowicz *et al.*, 2012; Flügel *et al.*, 2012). In dieser Arbeit wurde die Infektion von Tomatenpflanzen größtenteils über Wurzelinfektionen durchgeführt. Der Vorteil einer Wurzelinfektion gegenüber der Petiolusinfektion ist, dass schon zehn Tage alte Pflanzen infiziert werden können, anschließend innerhalb von zwei bis vier Wochen Krankheitssymptome auftreten und die Pflanzen schnell absterben. Vom Zeitpunkt der Infektion bis zum Absterben der Pflanze vergehen somit nur etwa vier bis fünf Wochen. Die Hauptursache für eine Infektion von Tomatenpflanzen mit *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* ist allerdings eine Kontamination der Samen (de León *et al.*, 2006). Diese kann in der Landwirtschaft nicht nur durch unsauberes Arbeiten stattfinden, sondern auch durch das Eindringen der Bakterien in die entstehenden Tomatenfrüchte infizierter Pflanzen. Dabei ist bis jetzt unklar, wie *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* vom Samen in den Keimling gelangt. Xu und Kollegen konnten eine Anhäufung von biolumineszenten *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*-Stämmen in den Cotyledonen (die ersten zwei Blätter des Keimlings) und im Hypocotyl (Stängelabschnitt bis zu den Cotyledonen) nachweisen (Xu *et al.*, 2010). Zur Analyse der Samenbesiedelung aus infizierten Tomatenfrüchten war in dieser Arbeit die

Petiolusinfektion die bevorzugte Methode, da eine Wurzelinfektion mit dem Wildtypstamm *Cmm*382 vor der Ausbildung von Früchten für die Pflanze letal ist. Zusätzlich wurde die *in vitro*-Infektion von sterilisierten Samen mit *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* untersucht.

4.3.1 Analyse von Krankheitssymptomen

Zur Analyse von Krankheitssymptomen wurden zehn Tage alte Pflanzen im Zwei-Blatt-Stadium mit einer *Cmm*382-Suspension (oD_{580} = 4) über die Wurzeln infiziert. Etwa eine Woche nach der Infektion traten die ersten Krankheitssymptome auf, die sich in den folgenden Tagen verstärkten, sodass nach etwa zwei bis vier Wochen die Pflanzen abstarben (Abbildung 11, B).

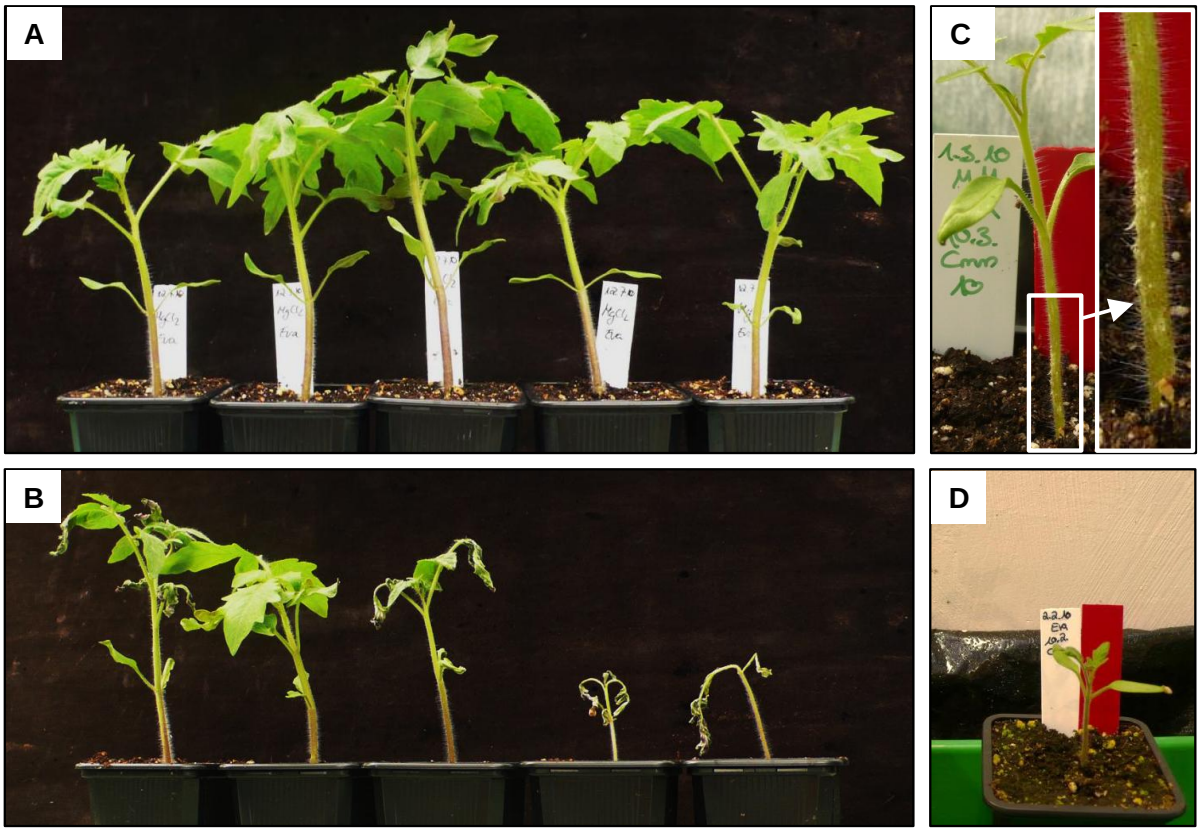


Abbildung 11: Krankheitssymptome von Tomatenpflanzen, 15 Tage nach der Wurzelinfektion mit *Cmm*382. A: Fünf mit 10 mM $MgCl_2$ behandelte Pflanzen (Kontrolle). **B:** Fünf mit *Cmm*382 infizierte Pflanzen. Welkesymptome waren in unterschiedlichen Wachstumsstadien zu erkennen. **C + D:** Weitere beobachtete Krankheitssymptome nach der Infektion mit *Cmm*382 waren Stängelläsionen und ein verringertes Wachstum.

Als Krankheitssymptome traten Blattwelke, Stängelläsion und verringertes Wachstum auf. War eine Blattwelke dabei sehr früh zu erkennen (3 dpi), trat diese zusammen mit einem verringerten Wachstum auf und die Pflanzen starben nach etwa 14 Tagen ab (Abbildung 11,

B, rechts). War die Blattwelke sehr spät sichtbar (10 dpi), wenn an der Pflanze schon etwa 15-20 Blätter zu erkennen waren (Abbildung 11, B, links), trat davor meist eine Stängelläsion auf und es dauerte länger, bis die Pflanzen abstarben. Stängelläsionen traten allgemein in der Regel zusammen mit einer Blattwelke auf. Bei sehr kleinen Pflanzen war eine Stängelläsion schwer oder gar nicht zu erkennen, da die Stängel sehr dünn blieben. Eine Stängelläsion wurde zum Teil auch als erstes Krankheitssymptom der Pflanze beobachtet, wenn noch keine Welke zu erkennen war (Abbildung 11, C). Infizierte Pflanzen zeigten in seltenen Fällen auch 2-3 Wochen nach der Infektion keine sichtbaren Krankheitssymptome, wie Welke oder Stängelläsion. Sie waren jedoch im Vergleich zu gesunden Pflanzen erheblich in ihrem Wachstum eingeschränkt (Abbildung 11, D). Insgesamt traten somit Krankheitssymptome nach einer Infektion mit *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* sehr inkonsistent auf, was die Analyse der Wirt-Pathogen-Interaktion erschwert.

4.3.2 Analyse der Samenbesiedelung in infizierten Tomatenpflanzen

Zur Analyse der Früchte und Samen infizierter Pflanzen wurde eine Petiolusinfektion durchgeführt. Vier Wochen alte Pflanzen wurden mit einer *Cmm*382-Suspension (oD_{580} = 4) infiziert. Nach 25 Tagen zeigten die Pflanzen erste Welkesymptome, nach zwei Monaten waren die ersten Früchte sichtbar. Die für eine Infektion mit *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* typischen *birds eyes* waren jedoch nicht erkennbar. Der Stängel der infizierten Pflanze verholzte im Laufe der Zeit (Daten nicht gezeigt). Aus den Früchten wurden die Samen geerntet, wobei ein Teil davon neu ausgesät wurde, um zu untersuchen, ob Krankheitssymptome im Keimling auftraten. 80 % der Samen keimten, die entstehenden Pflanzen zeigten jedoch keine Krankheitssymptome wie Welke, Stängelläsion oder ein verringertes Wachstum. Ein anderer Teil der Samen wurde für 2 h in 10 mM K_2PO_4-Puffer bei 26°C inkubiert, um Bakterien von der Samenoberfläche zu isolieren. Anschließend wurde die Suspension auf TBY-Agar ausplattiert und mehrere Tage inkubiert. Durch die unsterilen Samen waren die Platten jedoch kontaminiert und ein mögliches Bakterienwachstum konnte somit nicht ermittelt werden.

Um das Problem der Kontamination von isolierten Samen zu umgehen und die Bakterien außerdem mittels GFP-Fluoreszenzmikroskopie *in vivo* zu detektieren, wurde der Wildtypstamm *Cmm*382 mit dem Vektor pDM302P*pat-1gfp* transformiert, der das Gen für eine Neomycin-Resistenz trägt. Das natürliche Plasmid pCM1 und der Vektor pDM302 können aufgrund der Inkompatibilität nicht gleichzeitig in der Bakterienzelle vorkommen. Nach der Elektroporation der Bakterien mit pDM302P*pat-1gfp* ging pCM1 verloren, sodass der Stamm *Cmm*102pDM302P*pat-1gfp* resultierte, der nur noch pCM2 als natürliches Plasmid besaß. Dieser konnte auf TBY-Platten mit Neomycin selektiert werden. *Cmm*102 löst

in der Wirtspflanze nur noch abgeschwächte Krankheitssymptome aus und die Pflanze bildet trotz früher Infektion Früchte. Aus diesem Grund wurde in diesem Experiment die Wurzelinfektion an Stelle der Petiolusinfektion durchgeführt. Neben dem *Cmm*102-Stamm wurde der Stamm *Cmm*100pDM302P*pat-1gfp* verwendet. *Cmm*100 enthält weder pCM1 noch pCM2, wodurch die Pflanze zwar besiedelt werden kann, aber keine Krankheitssymptome ausgelöst werden. 42 dpi zeigten Pflanzen, die mit dem *Cmm*102-Stamm infiziert worden waren, erste Welkesymptome, die sich im Laufe der Zeit auf die gesamte Pflanze erstreckten (Abbildung 12, B). Im Gegensatz dazu zeigten *Cmm*100-infizierte Pflanzen keine Krankheitssymptome (Abbildung 12, A).

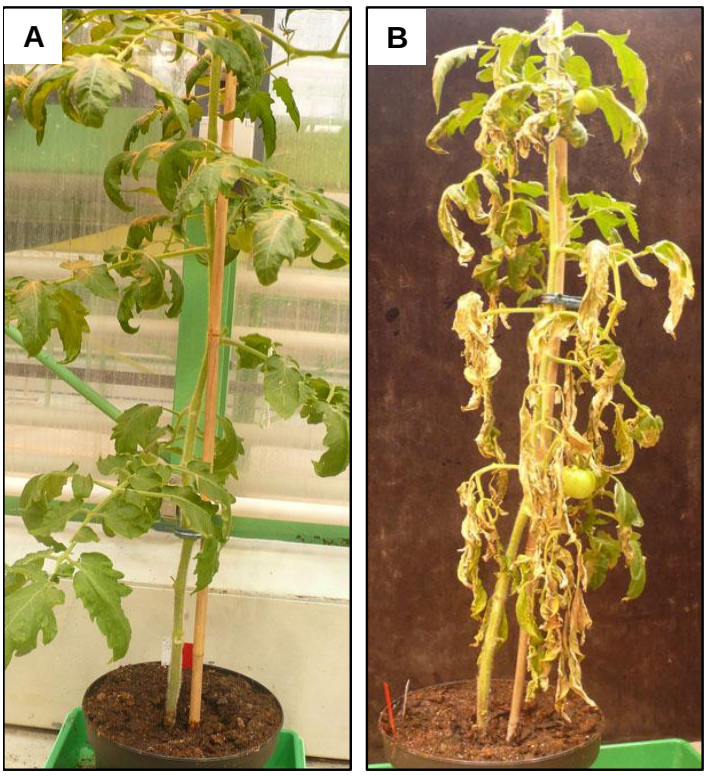


Abbildung 12: Krankheitssymptome nach der Wurzelinfektion mit *Cmm*102pDM302P*pat-1gfp*. A: Tomatenpflanze, acht Wochen nach der Infektion mit *Cmm*100pDM302P*pat-1gfp* ohne Krankheitssymptome. **B:** Tomatenpflanze, zehn Wochen nach der Infektion mit *Cmm*102pDM302P*pat-1gfp* mit starker Blattwelke, Stängelläsion und ersten Tomatenfrüchten.

Von den infizierten Pflanzen wurden je zwei Pflanzen pro Stamm für die Ernte der Früchte weiter angezogen, um das Eindringen der Bakterien in die Samen zu überprüfen. Nur bei einer der mit *Cmm*102pDM302P*pat-1gfp* infizierten Pflanzen wurden Früchte ausgebildet, die 15 Wochen nach der Infektion für weitere Analysen verwendet wurden. Aus den zwei Früchten wurden die Samen isoliert, die entweder intakt verwendet oder geöffnet wurden, um den Pflanzenembryo (Abbildung 13) daraus zu isolieren.

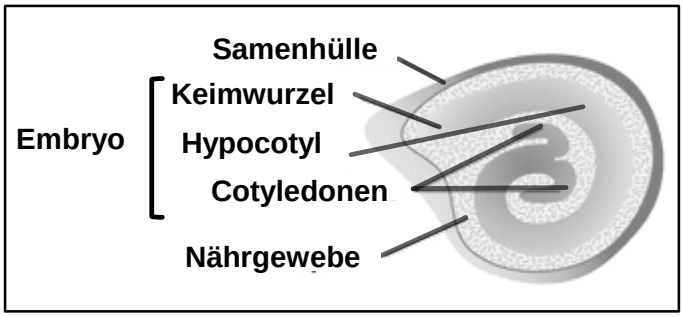


Abbildung 13: Aufbau eines Tomatensamens. Der Embryo, bestehend aus Keimwurzel, Hypocotyl und den zwei Cotyledonen, wird von einem Nährgewebe umgeben und von einer festen Samenhülle geschützt. Bei der Keimung wird die Samenhülle mit den Keimwurzeln durchstoßen (modifiziert nach http://www.accessscience.com/search.aspx?rootID=802561).

Die intakten Samen sowie der Embryo wurden für 2 h in 10 mM K_2PO_4-Puffer bei 26°C inkubiert, um die Bakterien zu isolieren. Die Suspensionen wurden daraufhin auf TBY-Agarplatten mit 50 µg/ml Neomycin für drei bis fünf Tage bei 28°C inkubiert. *Cmm*102pDM302P*pat-1gfp* konnte, im Gegensatz zum *Cmm*100-Stamm, in der Samensuspension nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Beide Stämme wurden nicht in der Embryo-Suspension identifiziert. Je fünf Samen aus den Früchten der mit *Cmm*102pDM302P*pat-1gfp* und *Cmm*100pDM302P*pat-1gfp* infizierten Pflanzen wurden ausgesät. Die Pflanzen, die daraus hervorgingen, zeigten auch noch 50 dpi keine Krankheitssymptome (Daten nicht gezeigt).

Der Stamm *Cmm*102pDM302P*pat-1gfp* konnte somit in die Tomaten und auf die Samenoberfläche gelangen, ein Eindringen in den Samen wurde jedoch nicht nachgewiesen. Eine Detektion der Bakterien in Stängelquer- und Stängellängsschnitten mittels Fluoreszenzmikroskopie war in dieser Arbeit nicht erfolgreich.

4.3.3 Analyse der Samenbesiedelung nach einer *in vitro*-Infektion

Um die *in vitro*-Infektion steriler Samen mit *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* zu analysieren, wurden die Samen gesunder Tomatenpflanzen sterilisiert und für 15 min in einer Bakteriensuspension (oD_{580} = 8) inkubiert. Als Bakterienstämme wurde der Wildtypstamm *Cmm*382, der plasmidfreie Stamm *Cmm*100 und der GFP-exprimierende Stamm *Cmm*102pDM302P*pat-1gfp* verwendet. Je 20 Samen wurden in den Bakteriensuspensionen oder in 10 mM $MgCl_2$ als Kontrolle inkubiert. Die weitere Inkubation der Samen erfolgte auf MS-Agar (Pflanzennährmedium) im Lichtschrank. 7 dpi wurden die noch in der Samenhülle liegenden Embryos auf eine mögliche bakterielle Infektion hin untersucht. Dazu wurden je fünf Samen geöffnet und Samenhülle, Keimwurzel, Hypocotyl und Cotyledonen über Nacht in 500 µl 10 mM K_2PO_4-Puffer bei 26°C inkubiert. Bei den mit *Cmm*102pDM302P*pat-1gfp*

infizierten Samen wurden der Suspension jeweils 50 µg/ml Neomycin zugefügt. Um eine mögliche Fremd-Kontamination zu vermeiden, wurden die Suspensionen auf für *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* spezifisches Minimalmedium oder auf TBY-Agarplatten mit 50 µg/ml Neomycin ausplattiert und drei bis fünf Tage bei 28°C inkubiert. Bei den bakteriell infizierten Samen wurden die meisten Bakterien auf der Samenhülle identifiziert, aber auch im Pflanzenembryo wurden welche nachgewiesen. Beim Öffnen der Samenhülle könnte es jedoch zu einer Kontamination des Embryos mit den Bakterien der Samenhülle gekommen sein. Ein selbstständiges Eindringen der Bakterien in den Samen wurde somit in dieser Arbeit nicht nachgewiesen. In weiteren Experimenten wurden die infizierten Samen, die noch nicht gekeimt waren, drei Wochen nach der Infektion mit 1%iger (v/v) Natriumhypochlorit-Lösung sterilisiert. Bakterien auf der Samenoberfläche werden damit abgetötet, sodass bei der Isolation des Embryos eine Kontamination mit den Bakterien der Samenhülle vermieden wird. Dazu wurden je sechs der infizierten Samen pro Stamm verwendet. Jeweils drei Samen wurden anschließend intakt in 10 mM K_2PO_4-Puffer inkubiert, von drei weiteren wurde lediglich der Pflanzenembryo verwendet. Die Suspensionen wurden wie oben beschrieben ausplattiert und die Platten einige Tage bei 28°C inkubiert. Auf allen Platten wurden keine Bakterien nachgewiesen. Entweder wurden Bakterien, die in den Samen eindringen konnten, durch das Natriumhypochlorit abgetötet oder es war den Bakterien nicht möglich, in den Samen zu gelangen.

Drei Wochen nach der Sameninfektion mit *Cmm*382, *Cmm*100 und *Cmm*102pDM302P*pat-1gfp* waren jeweils zwei der infizierten Samen gekeimt. Der Keimling wurde in Samenhülle, Wurzel, Hypocotyl und Cotyledonen aufgeteilt. Die einzelnen Bestandteile wurden anschließend in 10 mM K_2PO_4-Puffer inkubiert, die Suspensionen ausplattiert und die Platten einige Tage bei 28°C gelagert. Die Stämme *Cmm*382 und *Cmm*100 konnten in den Suspensionen nicht nachgewiesen werden. *Cmm*102pDM302P*pat-1gfp* konnte im Keimling, jedoch nicht mehr auf der Samenhülle detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Die Bakterien waren vor allem in der Keimwurzel lokalisiert, konnten aber auch in abnehmender Kolonienzahl im Hypocotyl und den Cotyledonen nachgewiesen werden. Ein Eindringen des Stammes *Cmm*102pDM302P*pat-1gfp* von der Samenhülle in den Keimling wurde somit nachgewiesen. Um das Eindringen der Bakterien phänotypisch zu analysieren, wurden die Keimlinge, die aus den infizierten Samen hervorgingen, fünf Wochen nach der Infektion auf Krankheitssymptome untersucht (Abbildung 14).

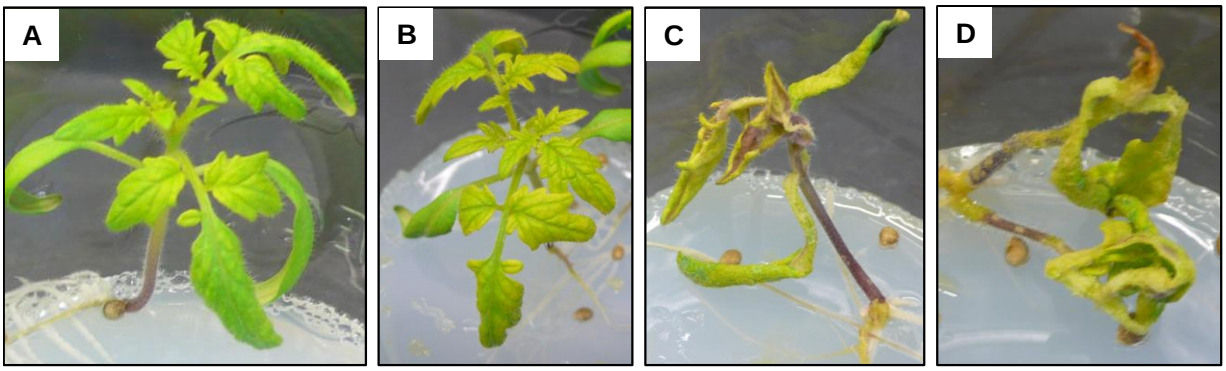


Abbildung 14: Krankheitssymptome von Tomatenkeimlingen, fünf Wochen nach der Infektion. Die Samen wurden *in vitro* in **A:** 10 mM $MgCl_2$, **B:** *Cmm*100, **C:** *Cmm*382 und **D:** *Cmm*102pDM302P*pat-1gfp* inkubiert. Eine Chlorose der Blätter war bei **B**, **C** und **D** sichtbar, Welke und Stängelläsion bei **C** und **D**.

Alle Keimlinge, die aus den bakteriell-infizierten Samen hervorgingen, zeigten eine Gelbfärbung (Chlorose) der Blätter (Abbildung 14, B-D). Die Pflanzen, die aus den *Cmm*382- und *Cmm*102pDM302P*pat-1gfp*-infizierten Samen hervorgingen, zeigten Welkesymptome und Stängelläsion (Abbildung 14, C und D). Durch eine Infektion von Tomatenpflanzen mit dem plasmidfreien Stamm *Cmm*100 werden normalerweise keine Krankheitssymptome ausgelöst. Die Chlorose der Blätter in den Keimlingen, die aus *Cmm*100-infizierten Samen hervorgingen trat deshalb wahrscheinlich unabhängig von der Infektion auf, da auch bei $MgCl_2$-behandelten Pflanzen eine leichte Chlorose zu erkennen war (Abbildung 14, A). Warum die Keimlinge der *Cmm*382-infizierten Samen Welke und Stängelläsion zeigten, die Bakterien aber nicht in den Suspensionen nachgewiesen werden konnten, die Bestandteile des Pflanzenembryos enthielten, ist unklar. Ob die Bakterien schon während der Samenruhe in den Embryo gelangen konnten oder erst, wenn die Keimwurzeln die Samenhülle durchbrochen hatte, konnte nicht geklärt werden. Ein Eindringen des plasmidfreien Stammes *Cmm*100 von der Samenhülle in den Embryo konnte nicht gezeigt werden.

4.4 Analyse von Virulenzfaktoren

Bis jetzt wurden nur wenige Virulenzfaktoren in *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* charakterisiert. Die Analyse dieser Virulenzfaktoren wurde vor allem gezielt mittels Mutagenese-Studien durchgeführt. Die Identifizierung unbekannter und die Verifizierung putativer Virulenzfaktoren wurden von Flügel und Kollegen mittels Microarray-Studien durchgeführt (Flügel *et al.*, 2012). Die zu analysierende RNA wurde dabei aus Bakterien isoliert, die sich entweder in der Pflanze vermehrten oder in Minimalmedium mit 5 % (w/v) Pflanzenhomogenat kultiviert wurden. Zur Analyse und Charakterisierung von Virulenzfaktoren wurden in dieser Arbeit mehrere Methoden verwendet. Eine direkte Isolierung der

Bakterien aus dem Xylemsaft infizierter Pflanzen war nicht möglich. Wurde der Xylemsaft infizierter Pflanzen isoliert und auf Agar-Platten drei bis fünf Tage bei 28°C inkubiert, konnten keine Bakterien nachgewiesen werden. Eine Vermutung war, dass die Bakterien sich an die Pflanzenzellen angeheftet oder Aggregate gebildet hatten, sodass sie nicht mit dem Xylemsaft zusammen isoliert werden konnten. Deshalb wurde ein synthetisches Xylemsaft-imitierendes Medium hergestellt, um Virulenzfaktoren auf Proteom- und Transkriptionsebene zu analysieren. Auf Proteomebene wurden Oberflächenproteine, zytoplasmatische und extrazelluläre Proteine isoliert und analysiert. Dabei wurden die Proteine aus einer Bakterienkultur in Minimalmedium und Xylemsaft-imitierendem Medium verglichen.

4.4.1 Xylemsaft-imitierendes *in vitro*-Medium (XMM)

Die Induktion der Expression von Virulenzgenen in synthetischen Medien wurde für *Pseudomonas*-Spezies, für *E. amylovora* und für *X. campestris* pv. *vesicatoria* gezeigt (Arlat *et al.*, 1992; Huang *et al.*, 1992; Wei *et al.*, 1992; Wengelnik *et al.*, 1996). Das *in vitro*-Medium soll dabei die Bedingungen *in vivo* imitieren, um die Expression von Virulenzfaktoren zu ermöglichen. *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* ist in der Tomatenpflanze im Xylem lokalisiert. Um ein Bakterien-spezifisches *in vitro*-Medium herzustellen, wurden deshalb in dieser Arbeit zuerst die Bestandteile des Xylemsaftes analysiert, um anschließend ein synthetisches Medium herzustellen, das die Bedingungen im Xylem repräsentiert. Der Xylemsaft enthält, neben Mineralstoffen aus dem Wasser, Aminosäuren und organische Anionen, wie Malat, Citrat und Succinat (López-Millán *et al.*, 2000; Buhtz *et al.*, 2004). Glucose und Fructose sowie geringe Saccharose-Konzentrationen wurden im Xylemsaft der Zuckerrübe identifiziert (López-Millán *et al.*, 2000). Nitrat ist das vorherrschende Anion im Xylemsaft, der Transport von Ammonium ist umstritten (Köhler *et al.*, 2002; Schjoerring *et al.*, 2002). Der Xylemsaft wurde in dieser Arbeit aus vier Wochen alten Tomatenpflanzen isoliert und die Konzentrationen von Nitrat, Ammonium, der Zucker Glucose, Fructose und Saccharose sowie der Aminosäuren wurden ermittelt (Tabelle 7).

Tabelle 7: Konzentrationsbestimmung der Inhaltsstoffe im Xylemsaft und im *in vitro*-Medium XMM (*xylem mimicking medium*: XMM). ---: nicht gemessen.

Inhaltsstoff	**Xylemsaft (pH = 5-6)**	***In vitro*-Medium XMM (pH = 6,7)**
Nitrat	33,3 ± 1,4 mM	23,4 ± 5,1 mM
Ammonium	1,9 ± 0,2 mM	1,6 ± 0,3 mM
Zucker Glucose Fructose Saccharose	[mM] 0 0 0	[mM] 0 0 0

Inhaltsstoff	**Xylemsaft (pH = 5-6)**	***In vitro*-Medium XMM (pH = 6,7)**
Aminosäuren	[µM]	[µM]
Glutamin	40-557	33-79
Asparagin	20-131	0
Alanin	2.2-61	88-220
Prolin	3.3-44	174-448
Histidin	5.3-42	22-56
Leucin	5.5-36	126-294
Valin	7.6-35	93-224
Threonin	5.9-33	38-114
Glutamat	8-30	176-414
Arginin	7-27	66-164
Lysin	7.8-26	66-163
Serin	7.8-26	90-219
Isoleucin	6-24	66-141
Aspartat	6.4-22	71-172
Glycin	2.7-11	46-118
Phenylalanin	1.5-11	52-134
Tyrosin	1.6-9	10-26
Methionin	0.3-0.4	16-40
Cystein	---	---
Tryptophan	---	---

Die Konzentrationsbestimmung erfolgte in Duplikaten oder Triplikaten. Die Nitrat-, Ammonium- und Zuckerkonzentrationen wurden über einen optischen Test bestimmt, die Konzentrationen der Aminosäuren über eine *Reversed Phase* Chromatographie. Der Xylemsaft enthielt etwa 33 mM Nitrat, 1,9 mM Ammonium und keine der analysierten Zucker (Tabelle 7). Die Konzentrationen der Aminosäuren waren bei den zwei durchgeführten Messungen sehr unterschiedlich (Tabelle 7). Glutamin und Asparagin lagen dabei jeweils in der höchsten Konzentration vor. Der pH-Wert des Xylemsaftes lag zwischen 5 und 6.

Als Grundlage für das *in vitro* Xylemsaft-imitierende Medium wurde ein für *X. campestris* pv. *vesicatoria* entwickeltes Apoplasten-Medium (XVM2) verwendet (Wengelnik *et al.*, 1996). XVM2 ermöglichte erstmals die Induktion von *hypersensitive response* (*hrp*) Genen in einem synthetischen Medium. Es enthält 20 mM NaCl, 10 mM $(NH_4)_2SO_4$, 5 mM $MgSO_4$, 1 mM $CaCl_2$, 0,16 mM KH_2PO_4, 0,32 mM K_2HPO_4, 0,01 mM $FeSO_4$, 10 mM Fructose, 10 mM Saccharose und 0,03 % (w/v) *casamino acids*, eine Mischung aller 20 Aminosäuren. Der pH-Wert lag bei 6,7. Um das Medium den Bedingungen im Xylem anzupassen, wurden sukzessiv einzelne Komponenten verändert. Da Nitrat die vorwiegende Stickstoffquelle im Xylemsaft ist (Tischner, 2000; Köhler *et al.*, 2002) wurde anstelle von Ammoniumsulfat für das *Clavibacter*-Medium KNO_3 (20 mM) verwendet. Nitrat kann von *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* nicht reduziert werden, da keine Gene vorhanden sind, die für eine Nitrat- oder

Nitritreduktase kodieren (Gartemann *et al.*, 2008). Zur Überprüfung, ob Stickstoff in Form von Ammonium oder Nitrat für das Wachstum von *Cmm*382 notwendig ist, wurden die Bakterien in XVM2-Medium ohne $(NH_4)_2SO_4$ oder KNO_3 getestet. Das Wachstum in diesem Medium war vergleichbar mit dem Wachstum im unveränderten XVM2-Medium (Daten nicht gezeigt). Trotz der Beobachtung, dass Nitrat anscheinend nicht notwendig für das Wachstum der Bakterien ist, wurde für das synthetische Medium Nitrat verwendet, da dieses auch im Xylemsaft gemessen wurde. Zucker werden im Phloem transportiert (Windt *et al.*, 2009) und wurden in dieser Arbeit im Xylemsaft nicht identifiziert (Tabelle 7). Fructose und Saccharose, die in XVM2 enthalten sind, wurden deshalb im *Clavibacter*-Medium nicht verwendet. Ein Wachstum von *C. michiganensis subsp. michiganensis* war nicht möglich, wenn keine Zucker vorhanden waren und die Aminosäuren-Konzentration zu gering war (Daten nicht gezeigt). Die fehlende Kohlenstoffquelle wurde deshalb durch die Erhöhung der Aminosäuren-Konzentration von 0,03 % (w/v) auf 0,2 % (w/v) ersetzt, da für einige Aminosäuren, zum Beispiel Glutamat und Alanin, bekannt ist, dass sie als Kohlenstoffquelle dienen können (Romano & Nickerson, 1958).

Das auf diese Weise adaptierte Medium wurde XMM (*xylem mimicking medium*) bezeichnet und setzt sich aus folgenden Komponenten zusammen: je 20 mM NaCl und KNO_3, 5 mM $MgSO_4$, 1 mM $CaCl_2$, 0,16 mM KH_2PO_4, 0,32 mM K_2HPO_4, 0,01 mM $FeSO_4$ und 0,2 % (w/v) *casamino acids*; pH 6,7. Die Generationszeit von *Cmm*382 in XMM-Medium betrug 10,7 h ± 0,97 h (Abbildung 15).

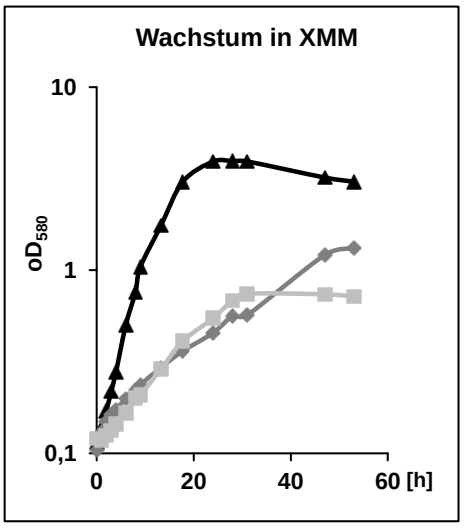


Abbildung 15: Wachstum von *Cmm*382 in XMM-Medium im Vergleich zu TBY- und M9-Medium. Die in XMM-Medium (hellgraue Quadrate) maximal erreichte oD_{580} von *Cmm*382 betrug 0,744, die Generationszeit 10,7 h ± 0,97 h. XMM-Medium enthält KNO_3 und 0,2 % (w/v) *casamino acids* als Kohlenstoff- und Stickstoffquelle. Die Zusammensetzung des XMM-Mediums ist wie folgt: je 20 mM NaCl und KNO_3, 5 mM $MgSO_4$, 1 mM $CaCl_2$, 0,16 mM KH_2PO_4, 0,32 mM K_2HPO_4, 0,01 mM $FeSO_4$, 0,2 % (w/v) *casamino acids*, pH 6,7. TBY-Medium: schwarze Dreiecke, M9-Medium: dunkelgraue Rauten.

Das Wachstum in XMM-Medium war in der exponentiellen Phase in etwa vergleichbar mit dem Wachstum in Minimalmedium, in dem die Generationszeit 12,28 h ± 0,6 h betrug. Um zu überprüfen, ob die Inhaltsstoffe in XMM-Medium mit denen des Xylemsaftes übereinstimmten, wurden die Konzentrationen von Nitrat, Ammonium, Glucose, Fructose, Saccharose und der Aminosäuren ermittelt (Tabelle 7). Das XMM-Medium enthält etwa 23 mM Nitrat, 1,6 mM Ammonium und keine der analysierten Zucker. Die Konzentrationen der Aminosäuren waren in den beiden durchgeführten Messungen nicht konsistent, wie es auch schon für den Xylemsaft beobachtet wurde. Die Aminosäuren Prolin, Leucin und Glutamat lagen in der höchsten Konzentration vor. Asparagin konnte nicht identifiziert werden. Das XMM-Medium wurde in Proteom- und Transkriptomanalysen als *in vitro*-Medium zur Analyse und Charakterisierung von Virulenzfaktoren getestet.

4.4.2 Proteomanalysen

Für die Virulenz von Bakterien spielen Oberflächenproteine und extrazelluläre Proteine bei der Interaktion mit der Wirtszelle eine Rolle. Oberflächenproteine können beim Kontakt mit der Wirtszell-Oberfläche, zum Beispiel bei der Anheftung, wichtig sein. Extrazelluläre Proteine können als hydrolytische Enzyme Bestandteile der pflanzlichen Zellwand angreifen oder als Effektoren im pflanzlichen Zytoplasma in die Abwehrreaktion der Pflanze eingreifen (Rietz & Parker, 2007). In dieser Arbeit wurde das Oberflächenproteom des Wildtypstammes *Cmm*382 und des plasmidfreien Stammes *Cmm*100 mittels 2D-Polyacrylamid-Gelelektrophorese untersucht. Außerdem wurde das zytoplasmatische und das extrazelluläre Proteom von *Cmm*382 analysiert, wobei Minimalmedium (M9) und Xylemsaft-imitierendes Medium (XMM) als Wachstumsmedien verwendet wurden.

4.4.2.1 Analyse der Oberflächenproteine

Für die Isolierung der Oberflächenproteine aus *Cmm*382 und *Cmm*100 wurden die Bakterien wie in Abschnitt 3.2.3 beschrieben kultiviert. Als Wachstumsmedium wurden 450 ml M9-Medium verwendet. Die Isolierung der Oberflächenproteine erfolgte mittels Phenolextraktion und Methanolfällung (Watt *et al.*, 2005). Für die anschließende isoelektrische Fokussierung wurden je 30 µg Proteine eingesetzt, die daraufhin gelelektrophoretisch aufgetrennt wurden. Die isoelektrische Fokussierung erfolgte in einem pH-Bereich zwischen 3 und 10. Das Experiment wurde drei Mal reproduziert, wobei Abbildung 16 die Gele mit der besten Auflösung der Proteine zeigt.

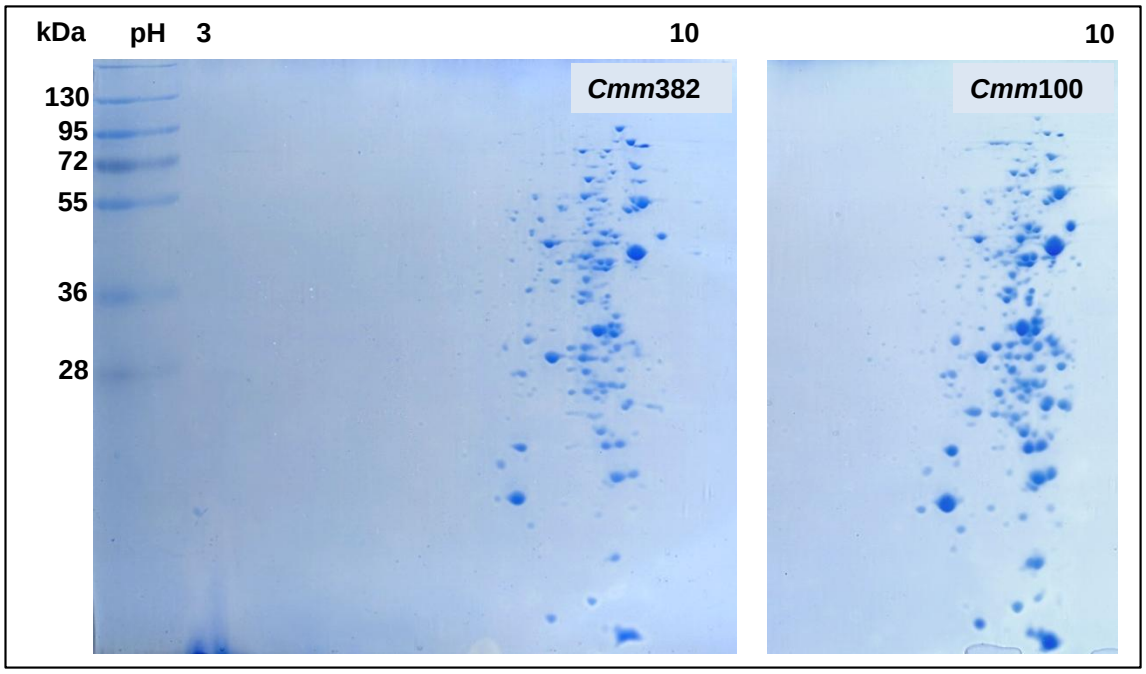


Abbildung 16: 2D-Gelelektrophorese des Oberflächenproteoms von *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*. Die mittels Phenolextraktion und Methanolfällung isolierten Proteine des Wildtypstammes *Cmm*382 und des plasmidfreien Stammes *Cmm*100 wurden in einem pH-Bereich zwischen 3 und 10 fokussiert und anschließend gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die Proteine sammelten sich in einem pH Bereich zwischen etwa 7 und 10.

Die Oberflächenproteine von *Cmm*100 und *Cmm*382 sammelten sich in einem pH-Bereich zwischen etwa 7 und 10. Das Proteinmuster war auf beiden Gelen vergleichbar (Abbildung 16). Die Protein-*Spots* waren auf dem Gel mit den Proteinen von *Cmm*100 stärker ausgeprägt als auf dem Gel mit den Proteinen von *Cmm*382. Die Proteine aus einer *Cmm*100-Kultur lagen somit in einer höheren Konzentration vor, weshalb zum Teil Protein-*Spots* sichtbar waren, die auf dem Gel mit den Proteinen aus einer *Cmm*382-Kultur nicht zu erkennen waren. Aufgrund der höheren Proteinkonzentration kann daraus jedoch nicht geschlossen werden, dass diese Proteine in *Cmm*100 aber nicht in *Cmm*382 auf der Oberfläche vorlagen.

Um eine bessere Auftrennung der einzelnen Proteine zu erhalten und mögliche Unterschiede zwischen dem Oberflächenproteom von *Cmm*382 und *Cmm*100 erkennen zu können, wurden erneut 2D-Gelelektrophorese-Experimente durchgeführt. Die Proteine wurden dieses Mal jedoch in einem pH-Bereich zwischen 6 und 11 fokussiert. In Abbildung 17 ist das Gel des Oberflächen-Proteoms von *Cmm*382 dargestellt.

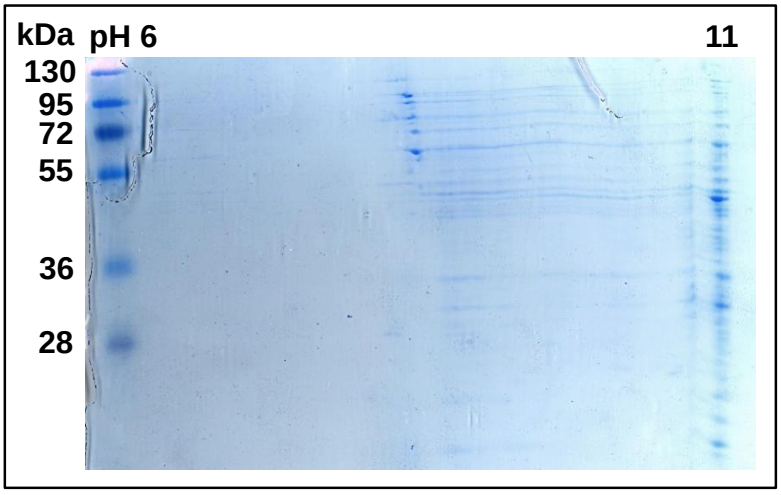
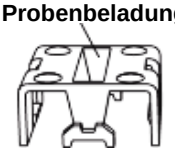


Abbildung 17: 2D-Gelelektrophorese des Oberflächenproteoms von *Cmm*382. Die mittels Phenolextraktion und Methanolfällung isolierten Proteine wurden in einem pH-Bereich zwischen 6 und 11 fokussiert und anschließend gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die Proteine sammelten sich in einem pH Bereich zwischen etwa 8 und 11.

Die Auftrennung des Oberflächenproteoms von *Cmm*100 war vergleichbar (Daten nicht gezeigt). In beiden Gelen waren keine voneinander unterscheidbaren Proteinpunkte zu erkennen. Die Proteine sammelten sich vor allem in einem pH-Bereich zwischen 8 und 11 und zeigten horizontales *shifting.* Diese Phänomen tritt bei einer Auftrennung in einem engen pH Bereich auf (Hoving *et al.*, 2002). Um das horizontale *shifting* zu vermeiden, wurden nacheinander einige Änderungen an dem Protokoll für die isoelektrische Fokussierung vorgenommen (Tabelle 8).

Tabelle 8: Vorgenommene Änderungen zur verbesserten Proteinauftrennung bei der 2D-Gelelektrophorese. Verändert wurden die Lösung zur Rehydratisierung der Gelstreifen vor der isoelektrischen Fokussierung sowie die Probenbeladung.

Änderung	**Quelle**
Rehydratisierungslösung + 0,6 % (w/v) DTT (Rehydratisierungslösung: Abschnitt 3.4.6, 6 M Harnstoff, 2 M Thioharnstoff, 4 % (w/v) CHAPS, 0,5 % (w/v) Pharmalyte™, 0,4 % (w/v) DTT, Bromphenolblau)	(Rehm, 2006)
Rehydratisierungslösung neu: 7 M Harnstoff, 2 M Thioharnstoff, 4 % (w/v) CHAPs, 2,5 % (w/v) DTT, 10 % (v/v) Isopropanol, 5 % (v/v) Glycerin, Bromphenolblau	(Hoving *et al.*, 2002)
Cup loading: Die Proteinlösung wird nach der Rehydratisierung während der isoelektrischen Fokussierung direkt über einen *sample cup* zugegeben. **Probenbeladung** 	Amersham Bioscience, 2-D *electrophoresis*, Benutzerhandbuch

Die ersten Änderungen betrafen die in Abschnitt 3.4.6 angegebene Lösung zur Rehydratisierung der Gelstreifen für die isoelektrische Fokussierung. Der Lösung wurden zuerst 0,6 % (w/v) DTT zugegeben. Die Auftrennung der Proteine nach der 2D-Gelelektrophorese war jedoch vergleichbar mit der Auftrennung in Abbildung 17 (Daten nicht gezeigt). Daraufhin wurden der Lösung 1 M mehr Harnstoff zugefügt, eine erhöhte DTT-Konzentration sowie Isopropanol und Glycerin. Die Gelstreifen wurden in dieser neuen Rehydratisierungslösung inkubiert. Die Zugabe der Proteinlösung erfolgte dabei nicht bei der Inkubation, sondern bei der nachfolgenden isoelektrischen Fokussierung über eine direkte Probenbeladung (*cup loading*). Dadurch wird eine identische Startposition für alle Proteine gewährleistet. Die Gele der nachfolgenden SDS-Gelelektrophorese sind in Abbildung 18 dargestellt.

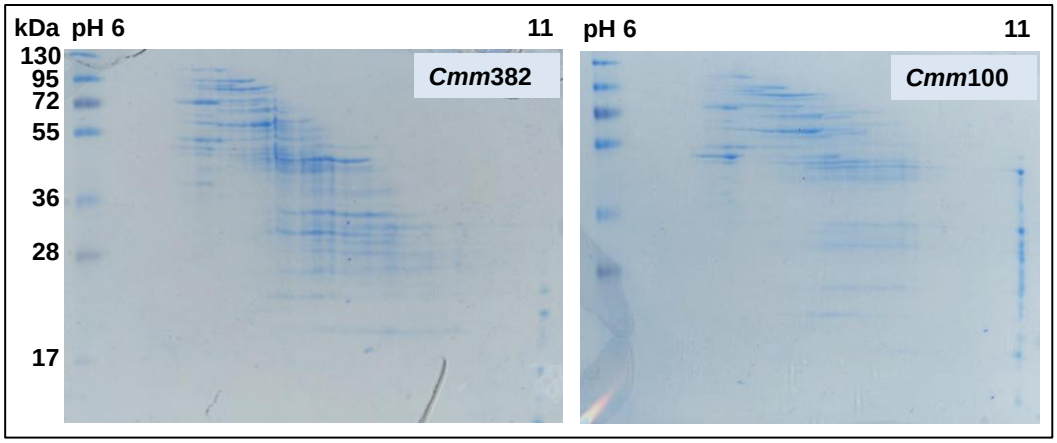


Abbildung 18: 2D-Gelelektrophorese des Oberflächenproteoms von *Cmm*382 und *Cmm*100 in einem pH-Bereich zwischen 6 und 11. Im Vergleich zur Abbildung 17 wurde eine veränderte Rehydratisierungslösung verwendet und die Proteine wurden direkt bei der isoelektrischen Fokussierung zugegeben (*cup loading*).

Die Auftrennung der Proteine wurde, verglichen mit der Auftrennung in Abbildung 17, verbessert. Eine entsprechend gute Auftrennung wie bei der 2D-Gelelektrophorese in dem pH-Bereich zwischen 3 und 10 (Abbildung 16) wurde jedoch nicht erreicht. Die Oberflächen-proteine von *Cmm*100- und *Cmm*382-Kulturen in M9-Medium wurden zusätzlich mittels MALDI-ToF Massenspektrometrie analysiert. Für *Cmm*382 wurde außerdem das Oberflächen-Proteom in XMM-Medium untersucht. In M9-Medium wurden für *Cmm*100 450 Proteine identifiziert, für *Cmm*382 340 Proteine (Daten nicht gezeigt). In XMM-Medium wurden für *Cmm*382 405 Proteine identifiziert (Daten nicht gezeigt). Die Anzahl der identifizierten Proteine entsprach etwa 10-13 % aller für Proteine kodierenden Sequenzen in *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*. Dabei waren nur ein geringer Teil der Proteine putative Oberflächenproteine, wie Substrat-Bindedomänen von ABC-Transportern oder Membranproteine. Daneben wurden extrazelluläre Proteine wie Serinproteasen identifiziert

und zytoplasmatische Proteine wie Transkriptionsregulatoren und ribosomale Proteine. Es wurden demnach nicht nur Oberflächenproteine isoliert, sondern auch zytoplasmatische und extrazelluläre Proteine. Aussagen über das Oberflächen-Proteom in *Cmm*100 und *Cmm*382 konnten somit in dieser Arbeit nicht getroffen werden.

4.4.2.2 Analyse extrazellulärer und zytoplasmatischer Proteine

Das extrazelluläre Proteom wurde in zwei verschiedenen Experimenten analysiert. Zum einen wurde untersucht, ob im Medienüberstand einer *Cmm*382- bzw. *Cmm*100-Kultur in M9-Medium Proteine enthalten waren, die eine Cellulase-, Protease- bzw. Pektinaseaktivität zeigten. Zum anderen wurden extrazelluläre Proteine aus einer *Cmm*382-Kultur in M9- bzw. XMM-Medium isoliert und mittels MALDI-ToF MS analysiert.

Analyse der Proteinaktivität mittels Zymographie

Die Analyse der Proteinaktivität wurde mittels Zymographie durchgeführt. Dabei wurde das für die Enzyme spezifische Substrat dem Trenngel eines SDS-Polyacrylamidgels zugefügt. Als Substrat für Cellulasen wurde Carboxymethylcellulose verwendet, für Proteasen Azocasein und für Pektinasen Pektin. Nach dem Gellauf wurden die Proteine renaturiert und das Gel wurde anschließend spezifisch behandelt, um das Substrat sichtbar zu machen. Meletzus und Kollegen konnten Cellulaseaktivität auf M9-Medium-Agarplatten im Wildtypstamm *Cmm*382 und im Stamm *Cmm*101 nachweisen, jedoch nicht in *Cmm*100 und *Cmm*102 (Meletzus *et al.*, 1993). Die Cellulaseaktivität korrelierte somit mit der Anwesenheit des natürlichen Plasmids pCM1, auf dem das Cellulasegen *celA* lokalisiert ist. Das sollte in dieser Arbeit mittels Zymographie bestätigt werden. Die Proteine des Medienüberstandes einer *Cmm*382- bzw. *Cmm*100-Kultur in M9-Medium wurden mittels Ammoniumsulfat gefällt. Nach der Fällung mit 40 % (w/v) und 60 % (w/v) Ammoniumsulfat wurden 18 µg Proteine für die Zymographie eingesetzt. Im Medienüberstand der *Cmm*100-Kultur wurde nach der Fällung mit 40 % (w/v) und 60 % (w/v) Ammoniumsulfat keine Cellulaseaktivität identifiziert (Abbildung 19 A, Spuren 1 und 3). Im Medienüberstand der *Cmm*382-Kultur konnten nach der Fällung mit 40 % (w/v) Ammoniumsulfat zwei Fragmente detektiert werden, die Cellulaseaktivität zeigten (Abbildung 19 A, Spur 2), nach der Fällung mit 60 % (w/v) Ammoniumsulfat war ein Cellulase-Fragment sichtbar. Trotz der eingesetzten hohen Menge an Proteinen war die detektierbare Cellulaseaktivität sehr schwach. Aufgrund des kaum erkennbaren Proteinmarkers konnte die Größe der Cellulase nicht ermittelt werden.

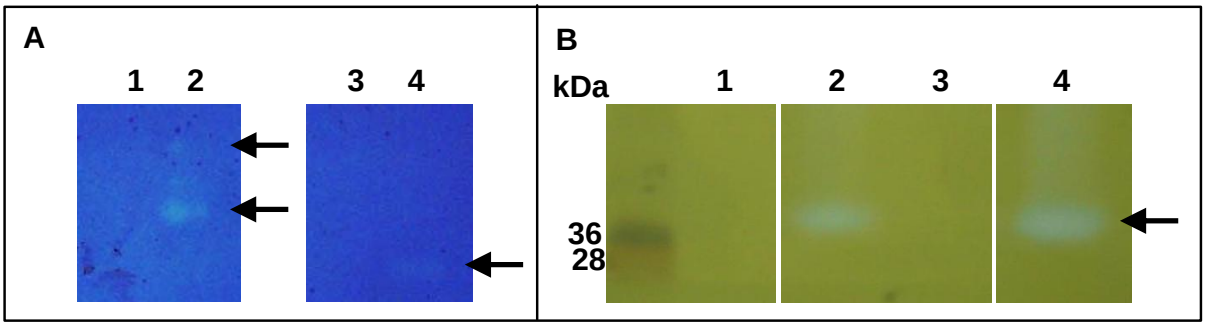


Abbildung 19: Zymographie der extrazellulären Proteine von *Cmm*382 und *Cmm*100 zur Analyse der Cellulase- und Proteaseaktivität. Die Proteine wurden aus den Medienüberständen einer *Cmm*100-Kultur mit 40 % (w/v) (Spur 1) und 60 % (w/v) Ammoniumsulfat (Spur 3) isoliert sowie aus einer *Cmm*382-Kultur mit 40 % (w/v) (Spur 2) und 60 % (w/v) Ammoniumsulfat (Spur 4). **A:** Nach der SDS-Gelelektrophorese wurden die Gele mit einer 0,5%ige (w/v) Congorot-Lösung gefärbt und mittels Coomassie *Brilliant Blue* gegengefärbt, woraufhin die Cellulaseaktivität als helle Bande gegen einen blauen Hintergrund zu erkennen war. **B:** Nach der SDS-Gelelektrophorese wurden die Gele mit 1 M NaOH gefärbt. Die Proteaseaktivität war als helle Bande gegen einen gelbfarbenen Hintergrund zu erkennen. Die Pfeile markieren die schwach sichtbaren Cellulase- und Proteaseaktivitäten.

Das Experiment wurde drei Mal wiederholt, wobei entweder der Proteinmarker oder die Cellulaseaktivität nur sehr schwach oder gar nicht zu erkennen waren (Daten nicht gezeigt). Es wurde dabei zum Teil nur das Fragment detektiert, welches in Abbildung 19 A (Spur 2) die stärkste Cellulaseaktivität zeigte. Die Größe dieses Fragments konnte dabei auf 50-60 kDa eingegrenzt werden. Die einzige annotierte und funktionsfähige Cellulase CelA ist mit 78 kDa etwas größer als das in dieser Arbeit detektierte 50-60 kDa-Proteinfragment (Eichenlaub & Gartemann, 2011). Jahr und Kollegen konnten jedoch ebenfalls kleinere Banden (54 und 43 kDa) nachweisen, die auf eine Spaltung des nativen Proteins zurück zu führen waren (Jahr *et al.*, 2000). Dadurch lag ein Fragment vor, das entweder nur aus der katalytischen Domäne der Cellulase bestand (43 kDa) oder zusätzlich aus der Cellulose-Binde-Domäne ohne C-Terminus (54 kDa). Da das am besten erkennbare Proteinfragment in Spur 2 (Abbildung 19 A) etwa 50 kDa groß war, könnten die anderen beiden Fragmente, die Cellulaseaktivität zeigten den von Jahr und Kollegen detektierten Fragmenten mit der Molekulargröße von 78 und 43 kDa entsprechen.

Für die Analyse der Proteaseaktivität wurden *Cmm*100- und *Cmm*382-Kulturen nach 24 und 48 h Wachstum in M9-Medium zentrifugiert und die Proteine mittels Filtration konzentriert. 18 µg Proteine wurden anschließend in der nachfolgenden Zymographie eingesetzt (Abbildung 19, B). Im Medienüberstand der *Cmm*100-Kultur war keine Proteaseaktivität zu erkennen (Spuren 1 und 3). Im Gegensatz dazu war im Medienüberstand der *Cmm*382-Kultur sowohl nach 24 als auch nach 48 h Proteaseaktivität sichtbar (Spuren 2 und 4). Das detektierte Fragment hatte eine Molekulargröße von etwa 40 kDa. Die Serinproteasen in

C. michiganensis subsp. *michiganensis* sind zwischen 30 und 38 kDa groß (Dreier *et al.*, 1997; Gartemann *et al.*, 2008). Aufgrund der fehlenden Proteaseaktivität im plasmidfreien Stamm *Cmm*100 kann die detektierte Proteaseaktivität von *Cmm*382 auf Gene zurückgeführt werden, die auf den natürlichen Plasmiden lokalisiert sind. Eine Pektinaseaktivität wurde weder im Medienüberstand einer *Cmm*382- noch in dem einer *Cmm*100-Kultur detektiert (Daten nicht gezeigt).

Identifizierung der Proteine mittels Massenspektrometrie

Für die Analyse extrazellulärer und zytoplasmatischer Proteine aus *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* mittels MALDI-ToF MS wurde der Wildtypstamm *Cmm*382 in je 450 ml M9- oder XMM-Medium kultiviert. Die Proteinfällung erfolgte mittels 10 % (w/v) Trichloressigsäure. Die isolierten extrazellulären und zytoplasmatischen Proteine wurden anschließend für etwa fünf Minuten in einem SDS-Gel aufgetrennt. Daraufhin wurden sie aus dem Gel ausgeschnitten und mittels MALDI-ToF MS analysiert. Das Experiment wurde jeweils drei Mal durchgeführt. Die Gesamtzahl aller identifizierten Proteine in den drei Replikaten ist in Tabelle 9 dargestellt.

Tabelle 9: Mittels MALDI-ToF MS identifizierte Proteine aus *Cmm*382 in M9- und XMM-Medium. Die Isolierung extrazellulärer und zytoplasmatischer Proteine erfolgte durch eine Trichloressigsäure-Fällung. Teilmenge: In allen drei Replikaten identifizierte Proteine.

Medium	Protein-Art	Gesamtzahl in Triplikaten	Teilmenge
M9	extrazellulär	302	40
XMM	extrazellulär	204	49
M9	zytoplasmatisch	354	82
XMM	zytoplasmatisch	578	91

Etwa 13-24 % der isolierten Proteine wurden in allen Replikaten identifiziert (Spalte "Teilmenge"). Die extrazellulären Proteine, die in allen drei Replikaten auftraten, sind in Tabelle 10 aufgelistet. Die identifizierten Proteine wurden in COG-Gruppen (*clusters of orthologous groups*: COG) eingeteilt. Diese wurden das erste Mal von Tatusov und Kollegen eingeführt, um die Proteine in unterschiedlichsten Genomen phylogenetisch zu klassifizieren (Tatusov *et al.*, 2000). Die Einteilung der Gene von *Cmm*382 in die entsprechenden COG-Gruppen und deren Annotation wurde in dieser Arbeit von Flügel und Kollegen übernommen (Flügel *et al.*, 2012).

Tabelle 10: Mittels MALDI-Tof MS identifizierte extrazelluläre Proteine aus *Cmm*382 in M9- und XMM-Medium. Dargestellt ist eine Liste der extrazellulären Proteine, die in allen drei Replikaten identifiziert wurden. Die entsprechenden Gene wurden in die COG-Gruppen eingeteilt. 29 Proteine wurden im Medienüberstand von M9- und XMM-Medium identifiziert, 11 nur in M9- und 20 nur in XMM-Medium. PBS: Penicillin-Bindeprotein, SBP: Substrat-Bindeprotein.

***Score* in XMM**	***Score* in M9**	**Gen-Name**	**mögliche Funktion**	**COG**
5.427	1.000	CMM_1675	*hypothetical secreted protein*	V.2
1.307	11.299	CMM_0338	*conserved secreted protein, putative PBP*	V.2
1.039	3.484	CMM_0976	*ABC transporter, SBP*	IV.1
910	---	CMM_1557	*hypothetical secreted protein*	V.2
873	365	CMM_1872	*conserved secreted protein, peptidoglycan-binding*	V.2
612	263	CMM_0866	*alpha-glucoside ABC transporter, SBP*	IV.1
431	1.052	CMM_2536 (*sbtC*)	*subtilisin-like extracellular serine protease, peptidase family S8A*	IV.6
353	1.004	CMM_0840	*NPL/P60 family secreted protein*	IV.6
326	---	CMM_0915 (*pbpC*)	*penicillin-binding protein*	II.2
326	519	CMM_0919 (*pbpD*)	*penicillin-binding protein*	II.2
324	---	CMM_0795	*extracellular nuclease/phosphatase*	IV.6
302	350	CMM_1865 (*ftsI*)	*peptidoglycan glycosyltransferase/PBP*	II.2
264	241	CMM_0839	*membrane bound metalloprotease*	IV.7
205	672	CMM_0042 (*ppaB1*)	*extracellular serine protease*	IV.6
205	672	CMM_0050 (*ppaB2*)	*extracellular serine protease*	IV.6
199	---	CMM_1250	*hypothetical secreted protein*	V.2
181	365	CMM_1842 (*ctaC*)	*cytochrome c oxidase, subunit 2*	I.1
180	---	CMM_2688	*acetyl xylan esterase*	I.1
166	438	CMM_2185	*peptide ABC transporter, SBP*	IV.1
165	241	CMM_2467	*hydrolase*	V.1
138	756	CMM_2283	*metal ABC transporter, SBP*	IV.1
108	---	CMM_2568 (*groES*)	*10 kDa chaperonin (protein Cpn10)*	IV.4
105	---	CMM_2535 (*sbtB*)	*subtilisin-like extracellular serine protease, peptidase family S8A*	IV.6
103	59	CMM_2566 (*livK*)	*branched-chain amino acid ABC transporter, SBP*	IV.1
94	679	CMM_0144	*conserved secreted protein*	V.2
92	---	CMM_0511	*conserved secreted protein*	V.2
84	192	CMM_0879	*sugar ABC transporter, SBP*	IV.1
73	---	CMM_2161	*peptidyl-prolyl isomerase*	IV.4
71	---	CMM_0819 (*wcoA*)	*cell surface protein*	II.2
68	---	CMM_2562 (*livH*)	*branched-chain amino acid ABC transporter, permease protein*	IV.1
67	129	CMM_0044 (*ppaC*)	*extracellular serine protease*	IV.6

***Score* in XMM**	***Score* in M9**	**Gen-Name**	**mögliche Funktion**	**COG**
66	782	CMM_0071 (*ppaE*)	*extracellular serine protease*	IV.6
61	---	CMM_0638	*membrane-metalloendopeptidase, subfamily M23B*	IV.7
56	40	CMM_1022 (*wcqK*)	*secreted protein*	II.2
56	38	CMM_0466	*conserved secreted protein*	V.2
56	---	CMM_0431	*hemagglutinin/hemolysin-related protein, possible cell surface protein*	IV.4
51	61	CMM_0931 (*pbpE*)	*D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase*	II.2
51	---	CMM_1790	*anion ABC transporter, SBP*	IV.1
47	635	CMM_0278	*chorismate mutase*	I.2
44	762	CMM_1942 (*ppaG*)	*extracellular serine protease*	IV.6
43	---	CMM_1800 (*aroE*)	*aminodeoxychorismate lyase*	I.5
42	51	CMM_0049 (*nagA*)	*beta-N-acetylglucosaminidase*	I.1
39	---	CMM_2434	*serine protease, family S1C*	IV.7
28	---	CMM_0627	*cell-wall associated protein*	II.2
26	1.507	CMM_2176	*conserved secreted lipoprotein*	IV.1
24	---	CMM_0337	*conserved secreted protein, putative carboxypeptidase or PBP*	V.2
21	---	CMM_0560	*transcriptional regulator*	IV.3
10	---	CMM_0911	*hypothetical protein (sortase-sorted)*	II.2
6	9	CMM_1480 (*expA*)	*expansin*	IV.6
---	633	CMM_0764 (*ppaF*)	*extracellular serine protease*	IV.6
---	197	CMM_2006 (*gluB*)	*glutamate ABC transporter, SBP*	IV.1
---	126	CMM_1389	*conserved secreted protein*	V.2
---	125	CMM_1611 (*cspA1*)	*cold shock protein*	IV.4
---	117	CMM_1960	*peptide ABC transporter, SBP*	IV.1
---	93	CMM_1744 (*gapA*)	*glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*	I.1
---	51	CMM_1835 (*qcrC*)	*ubiquinol-cytochrome c reductase, cytochrome c subunit*	I.1
---	45	CMM_1673 (*xysA*)	*endo-1,4-β-xylanase A*	IV.6
---	23	CMM_0039 (*chpE*)	*extracellular serine protease, family S1A*	IV.6
---	21	CMM_1557	*hypothetical secreted protein*	V.2
---	11	CMM_0608	*conserved secreted protein*	V.2

30 Proteine wurden sowohl im Medienüberstand einer M9-Kultur als auch in dem einer XMM-Kultur identifiziert (Tabelle 10). Davon konnten acht Proteine der COG-Gruppe IV.6 („extrazelluläre Enzyme“) zugeordnet werden. Außerdem wurden Substrat-Bindeproteine und weitere sekretierte Proteine identifiziert. Den höchsten *Score*-Wert in XMM-Medium erreichte mit etwa 5.400 Einheiten ein hypothetisches sekretiertes Protein (CMM_1675), für das in M9-Medium nur ein *Score*-Wert von 1.000 gemessen wurde. Es folgten mit etwa 1.000 *Score*-

Einheiten ein weiteres sekretiertes Protein (CMM_0338) und das Substrat-Binde-Protein eines ABC-Transporters (CMM_0976), die beide in M9-Medium mit 11.300 und 3.500 wesentlich höhere Werte erreichten als in XMM-Medium. Die *Score*-Werte von Serinproteasen lagen in M9-Medium um mindestens das doppelte höher als in XMM-Medium. Zehn Proteine wurden nur im Medienüberstand von M9-Medium und nicht in dem von XMM-Medium identifiziert. Dazu gehörten zum Beispiel PpaF und ChpE, zwei Serinproteasen sowie XysA, eine Xylanase. 19 Proteine wurden nur im Medienüberstand der XMM-Kultur identifiziert, darunter zwei Serinproteasen. Von den 46 Genen im Genom von *C. michiganensis* subsp. *michiganensis,* die für extrazelluläre Proteine kodieren (COG-Gruppe IV.6, Flügel *et al.*, 2012), wurden somit in dieser Arbeit mittels MALDI-ToF MS insgesamt 13 Proteine im Medienüberstand einer *Cmm*382-Kultur in M9- oder XMM-Medium identifiziert (Tabelle 10). Außerdem wurden 13 Proteine identifiziert, die als mögliche sekretierte Proteine annotiert worden waren. Zum Teil wurden jedoch im Medienüberstand auch nicht-extrazelluläre Proteine identifiziert, wie zum Beispiel das Chaperon GroES und ein Transkriptionsregulator. Die Analyse mittels MALDI-ToF MS ist sehr sensitiv und kann auch noch Protein im Femtomol-Bereich detektieren (Hou *et al.*, 2010). Bei einer leichte Verunreinigungen des Medienüberstandes mit zytoplasmatischen Proteinen werden diese ebenfalls identifiziert. Eine Liste aller 506 identifizierter extrazellulärer Proteine befindet sich im Anhang (Tabelle 19 und Tabelle 20). Bei der Analyse dieser Liste fiel auf, dass nur in einem der Triplikate Proteine identifiziert wurden, die plasmidkodiert (pCM1 oder pCM2) waren. Des Weiteren wurden in den einzelnen Replikaten weitere Serinproteasen und hydrolytische Enzyme identifiziert sowie sekretierte Proteine der COG-Gruppe V.2 (Tabelle 11). Im Medienüberstand einer *Cmm*382-Kultur in M9-Medium wurden, mit Berücksichtigung der Proteine, die nur in einem oder zwei der Replikate identifiziert worden waren, 23 extrazelluläre Proteine detektiert, in XMM-Medium waren es 22 Proteine.

Tabelle 11: Mittels MALDI-ToF MS identifizierte extrazelluläre oder sekretierte Proteine, die nur in einem oder zwei der Triplikate vorkamen. M: M9-Medium, X: XMM-Medium.

Funktion	**Medium**	**Gen-Name**
Serinprotease	X	CMM_0039 (*chpE*), CMM_0764 (*chpF*), CMM_1947 (*ppaH*), pCM2_0052 (*phpB*), pCM2_0053 (*phpA*)
	M	CMM_0070 (*sbtA*), CMM_2535 (*sbtB*)
	X, M	CMM_1948 (*ppaI*), pCM1_0023 (*ppaJ*), pCM2_0054 (*pat-1*)
Pektat-Lyase	X, M	CMM_0043 (*pelA1*), CMM_0051 (*pelA2*)
Nuklease/ Phosphatase	M	CMM_0795
Xylanase	X	CMM_1673 (*xysA*), CMM_1674 (*xysB*)

Funktion	Medium	Gen-Name
Endoglucanase	M	CMM_2692
Cellulase	X, M	pCM1_0020 (*celA*)
Polygalacturonase	M	CMM_2871
Metallopeptidase	M	CMM_2709
konservierte sekretierte Proteine	X	CMM_0429, CMM_0608, CMM_1389, CMM_1405, CMM_2204
	M	CMM_0178, CMM_0235, CMM_0337, CMM_0511, CMM_1411, CMM_2693, CMM_2921
	X, M	CMM_0128, CMM_0132, CMM_2252, CMM_2491
hypothetische sekretierte Proteine	X	CMM_2431, CMM_2549
	M	CMM_1081, CMM_1250, CMM_2902
	X, M	CMM_0441, CMM_1248, CMM_1921

Neben den extrazellulären Proteinen wurden in dieser Arbeit auch die zytoplasmatischen Proteine von *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* analysiert. Die zytoplasmatischen Proteine, die in allen drei Replikaten auftraten, sind in Tabelle 12 aufgelistet, wobei lediglich eine Einteilung in die jeweiligen COG-Gruppen vorgenommen wurde. Eine vollständige Liste der identifizierten zytoplasmatischen Proteine mit dem entsprechenden *Score*-Wert und der COG-Gruppe befindet sich im Anhang (siehe Abschnitt 0, Tabelle 21 und Tabelle 22).

Tabelle 12: Mittels MALDI-Tof MS identifizierte zytoplasmatische Proteine aus *Cmm*382 in M9- und XMM-Medium. Dargestellt sind die zytoplasmatischen Proteine, die in allen drei Replikaten identifiziert wurden und deren Zuordnung zu den COG-Gruppen.

COG-Gruppen	Kategorie	M9	XMM
I	**Metabolismus**	**25**	**40**
I.1	Energie- und Kohlenstoffwechsel	17	28
I.2	Aminosäurestoffwechsel	4	6
I.3	Nukleotidstoffwechsel	1	0
I.4	Lipidstoffwechsel	1	2
I.5	Stoffwechsel von Coenzymen und Vitaminen	1	3
I.6	Sekundärstoffwechsel	1	1
II	**Zelluläre Prozesse**	**3**	**3**
II.1	Zellzyklus	0	1
II.2	Zellwand	3	2
III	**Informationsspeicherung und -prozessierung**	**37**	**20**
III.1	Replikation und Reparatur	1	0
III.2	Transkription	0	0
III.3	Translation	36	20
IV	**Potentiell relevant in der phytopathogenen Interaktion**	**12**	**20**
IV.1	Transporter	2	9
IV.2	Proteintransport	0	0
IV.3	Regulatoren	0	0
IV.4	Stress	7	5
IV.5	Resistenz	2	3

COG-Gruppen	Kategorie	M9	XMM
IV.6	Extrazelluläre Enzyme	0	0
IV.7	Intrazelluläre Proteasen	1	3
V	**Unzureichend charakterisiert**	**5**	**8**
V.1	Allgemeine Funktion vorhersagbar	3	5
V.2	Unbekannte Funktion	2	3
	Summe	**82**	**91**

Die meisten der identifizierten Proteine sind am Energie- und Kohlenstoffmetabolismus (COG-Gruppe I.1) und an der Translation (COG-Gruppe III.3) beteiligt (Tabelle 12). In einer *Cmm*382-Kultur in XMM-Medium waren 20 Proteine vorhanden, denen eine mögliche Funktion bei der Wirt-Pathogen-Interaktion zugeordnet wurde, in M9-Medium waren es nur 12. Proteintransporter oder Regulatoren wurden keine identifiziert. Die Proteine, die den höchsten *Score*-Wert in einer *Cmm*382-Kultur in XMM-Medium aufwiesen, waren dabei die Chaperonin-Proteine GroES (CMM_2568; 2.155) und GroEL (CMM_2478; 1.412) sowie eine Enolase (CMM_2263; 1.614) (siehe Abschnitt 7.2, Tabelle 21). In einer *Cmm*382-Kultur in M9-Medium wiesen das Chaperonin-Protein GroEL (CMM_2478; 1.742) und ein DNA-Bindeprotein (CMM_2934; 807) die höchsten *Score*-Werte auf (siehe Abschnitt 7.2, Tabelle 21). Wie auch schon für die extrazellulären Proteine wurden einige zytoplasmatische Proteine lediglich in einem oder zwei der Replikate identifiziert. Die Liste der somit insgesamt detektierten zytoplasmatischen Proteine in M9-Medium (276) und XMM-Medium (335) befindet sich im Anhang (siehe Abschnitt 0, Tabelle 21 und Tabelle 22). In dieser Liste sind 39 zusätzliche Proteine der COG-Gruppe IV, die nur in einem oder zwei der Replikate in einer M9-Kultur identifiziert wurden und 44 zusätzliche Proteine in einer XMM-Kultur. Dabei waren jedoch lediglich sechs bzw. sieben Proteine Regulatoren. In beiden Medien wurden die Regulator-Gene CMM_1757, CMM_2468 und CMM_1884 exprimiert, in XMM-Medium zusätzlich CMM_2475, CMM_2724, CMM_0485 und CMM_1319 und in M9-Medium CMM_2462, CMM_1063 und pCM2_0036. Die *Score*-Werte lagen dabei im Mittel bei 40.

Zusammengefasst war somit in einer *Cmm*382-Kultur in XMM-Medium im Vergleich zu M9-Medium keine erhöhte Konzentration an Regulatoren zu erkennen, die zum Beispiel die Anpassung der Genexpression von Virulenzgenen an die veränderten Bedingungen hervorrufen könnten.

4.4.3 Transkriptomanalysen

Um die ermittelten Proteomdaten auf RNA-Ebene zu bestätigen und weitere Gene zu identifizieren, die bei der Virulenz des Bakteriums eine Rolle spielen, wurden Microarray-Experimente in drei bis fünf biologischen Replikaten durchgeführt. Dabei wurden die Transkriptmengen der Gene von *Cmm*382 nach der Kultivierung in zwei Medien verglichen.

Aus beiden Kulturen wurde die RNA isoliert, diese in cDNA umgeschrieben und mit je einem Farbstoff markiert. Dadurch konnten nach der Hybridisierung an die 3.107 Oligonukleotide auf dem Microarray-Chip Unterschiede in der Transkriptmenge ermittelt werden. Die Durchführung und Auswertung der Microarray-Experimente erfolgte am Lehrstuhl für Biochemie (Universität Erlangen-Nürnberg) gemeinsam mit Stephen Reid und Dr. Sophia Sonnewald. Die Gene wurden gemäß Flügel und Kollegen in die entsprechenden COG-Gruppen eingeteilt (Flügel *et al.*, 2012).

4.4.3.1 Vergleich: synthetisches Medium (XMM) und Minimalmedium (M9)

Um eine mögliche Änderung der Genregulation im synthetischen Medium XMM gegenüber Minimalmedium M9 zu überprüfen, wurde das Level der mRNA in einer *Cmm*382-Kultur in XMM-Medium mit dem in M9-Medium mittels Microarray-Experimenten verglichen. Von den 3.107 in *Cmm*382 analysierten Genen war die Transkriptmenge von 247 Genen in XMM-Medium höher als in M9-Medium und die von 179 Genen war niedriger (Tabelle 13).

Tabelle 13: Eine Liste der *Cmm*382-Gene aus DNA-Microarray-Experimenten, deren Transkriptmengen in XMM-Medium höher, bzw. niedriger waren als in M9-Medium. Gene, die eine statistisch relevante Änderung der Transkriptmenge zeigten (p-*value* ≤ 0,05; Benjamini-Hochberg Korrektur (Benjamini & Hochberg, 1995)), wurden in die entsprechenden COG-Gruppen eingeteilt. ↑: Höhere Transkriptmenge und ↓: niedrigere Transkriptmenge in XMM-Medium verglichen mit M9-Medium.

COG-Gruppe	Kategorie	↑ (247)	↓ (179)
I	**Metabolismus**	**55**	**42**
I.1	Energie- und Kohlenstoffwechsel	29	6
I.2	Aminosäurestoffwechsel	12	17
I.3	Nukleotidstoffwechsel	2	5
I.4	Lipidstoffwechsel	8	1
I.5	Stoffwechsel von Coenzymen und Vitaminen	4	7
I.6	Sekundärstoffwechsel	0	6
II	**Zelluläre Prozesse**	**5**	**7**
II.1	Zellzyklus	0	1
II.2	Zellwand	5	6
III	**Informationsspeicherung und -prozessierung**	**3**	**29**
III.1	Replikation und Reparatur	1	12
III.2	Transkription	0	3
III.3	Translation	2	14
IV	**Potentiell relevant in der phytopathogenen Interaktion**	**92**	**42**
IV.1	Transporter	68	13
IV.2	Proteintransport	1	3
IV.3	Regulatoren	10	18
IV.4	Stress	2	5
IV.5	Resistenz	6	2
IV.6	Extrazelluläre Enzyme	3	1
IV.7	Intrazelluläre Proteasen	2	0
V	**Unzureichend charakterisiert**	**92**	**59**

COG-Gruppe	Kategorie	↑ (247)	↓ (179)
V.1	Allgemeine Funktion vorhersagbar	22	9
V.2	Unbekannte Funktion	70	50

Die prozentuale Zuordnung der Transkripte zu den COG-Gruppen ist in Abbildung 20 graphisch dargestellt. Eine Auswahl dieser Gene ist in Tabelle 14 aufgelistet. Eine Liste aller Gene, die eine veränderte Transkriptmenge zeigten, befindet sich im Anhang (Tabelle 23 und Tabelle 24).

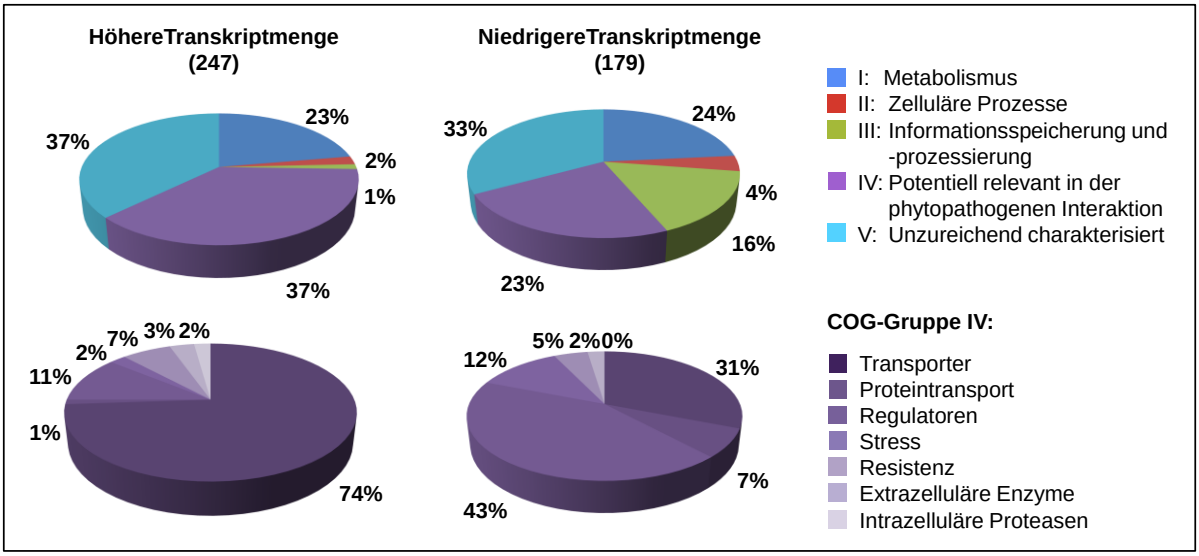


Abbildung 20: Prozentuale Zuordnung der Gene aus Tabelle 13 zu den COG-Gruppen. Verglichen wurden die Transkriptmengen der Gene von *Cmm*382 in XMM- und M9-Medium. Die Transkriptmengen von 247 Genen waren in XMM-Medium höher als in M9-Medium, die von 179 Genen war niedriger. Dargestellt sind die COG-Hauptgruppen sowie die COG-Gruppe IV.

66 % der Gene, die in XMM-Medium eine höhere Transkriptmenge aufwiesen als in M9-Medium und 17 % der Gene, die eine niedrigere Transkriptmenge aufwiesen, zeigten eine zwei- oder mehrfach veränderte Expression. Von den 179 Genen, deren Transkriptmengen in XMM-Medium niedriger waren als in M9-Medium, wurden 44 % den COG-Gruppen „Metabolismus“, „Zelluläre Prozesse“ und „Informationsspeicherung und -prozessierung“ zugeordnet (Tabelle 13 und Abbildung 20). Dabei waren vor allem die Transkriptmengen von Genen verändert, deren Genprodukte am Aminosäurestoffwechsel (COG-Gruppe I.2), an der Translation (COG-Gruppe III.3) sowie an der Replikation und Reparatur (COG-Gruppe III.1) beteiligt sind. 23 % der Gene, deren mRNA-Level in XMM-Medium niedriger war als in M9-Medium, wurden in die COG-Gruppe IV eingeordnet. Von diesen Genen kodieren 18 Gene für Regulatoren und 13 für Transporter (Tabelle 13). Die Transkriptmenge des Gens CMM_2931, das für einen Eisentransporter kodiert, war in XMM-Medium 6,84 Mal niedriger

als in M9-Medium (Tabelle 14). 33 % der Gene, deren mRNA-Level in XMM-Medium niedriger war als in M9-Medium gehörten der COG-Gruppe „unzureichend charakterisiert“ an.

Tabelle 14: Eine Auswahl der mittels Microarray identifizierten *Cmm*382-Gene, deren Transkriptmengen in XMM-Medium höher bzw. niedriger waren als in M9-Medium. Aufgelistet sind die COG-Gruppen der Gene und die absolute Änderung der Transkriptmenge (*fold change absolute*: FCA), die für niedrigere Mengen in XMM-Medium als negativer Wert angegeben ist.

COG	Gen-Name	FCA	Mögliche Funktion
I.1	CMM_0362	2,7	*α-glucosidase*
I.1	CMM_0883 (*bglJ*)	4,5	*β-glucosidase*
I.1	CMM_0105 (*ramA*)	2,4	*α-rhamnosidase*
I.1	CMM_1473 (*pckA*)	34,4	*phosphoenolpyruvate carboxykinase*
II.2	CMM_0245	5,8	*hypothetical secreted protein (sortase-sorted)*
IV.1	CMM_0685	3,4	*antimicrobial peptide ABC transporter, permease component*
IV.1	CMM_0684	3,4	*antimicrobial peptide ABC transporter, ATPase*
IV.1	CMM_1314	10,9	*iron ABC transporter, substrate-binding protein*
IV.1	CMM_0197	23,8	*sugar ABC transporter, permease component*
IV.1	CMM_0196	30,9	*sugar ABC transporter, substrat-binding protein*
IV.1	CMM_2931 (*fecB2*)	-6,84	*iron-siderophore ABC transporter, substrate-binding protein*
IV.2	CMM_1306	1.94	*putative secreted protein*
IV.3	CMM_0865	7,2	*transcriptional regulator, LacI family*
IV.5	CMM_0096 (*cytC*)	2,3	*ferredoxin reductase*
IV.5	CMM_0094 (*cytA*)	4,7	*cytochrom P450*
IV.5	CMM_0095 (*cytB*)	4,9	*3Fe-4S ferredoxin*
IV.6	CMM_2535 (*sbtB*)	2,6	*subtilisin-like extracellular serine protease, peptidase family S8A*
IV.6	CMM_1674 (*xysB*)	3,9	*endo-1,4-β-xylanase B*
IV.6	CMM_0795	5,53	*extracellular nuclease/phosphatase*
IV.6	CMM_0918	-1,53	*secreted phosphohydrolase*
V.1	CMM_2780	2,4	*sugar hydrolase*
V.2	pCM2_0059	16,14	*conserved hypothetical protein*

Von den 247 Genen, deren Transkriptmengen in XMM-Medium höher waren als in M9-Medium, wurden 24 % den COG-Gruppen „Metabolismus“, „zelluläre Prozesse“ und „Informationsspeicherung und -prozessierung“ zugeordnet (Tabelle 13 und Abbildung 20). Der Hauptanteil der Gene kodiert für Proteine des Energie- und Kohlenstoffwechsels (COG-Gruppe I.1) sowie für Proteine des Aminosäurestoffwechsels (COG-Gruppe I.2). Dazu gehören zum Beispiel die zwei Gene CMM_0362 und CMM_0883 (*bglJ*), die für Glucosidasen kodieren, sowie CMM_0105, welches für eine Rhamnosidase kodiert. Ebenfalls

zur COG-Gruppe I.1 gehört das Gen CMM_1473, das für eine Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase kodiert. Die Transkriptmenge von CMM_1473 war in XMM-Medium im Vergleich zu M9-Medium um den Faktor 34,4 höher (Tabelle 14), sodass es bei diesem Gen den größten Unterschied in der Transkriptmenge zwischen M9- und XMM-Medium gab. 37 % der Gene, deren mRNA-Level in XMM-Medium höher war als in M9-Medium, wurden der COG-Gruppe IV zugeordnet, deren Mitglieder vermutlich wichtig für die Wirt-Pathogen-Interaktion sind. 68 dieser Gene kodieren für Transporter (Tabelle 13), darunter auch die Gene CMM_0684 und CMM_0685, deren Genprodukte antimikrobielle Peptidtransporter sind (Tabelle 14). 28 Gene, deren Transkriptmengen in XMM-Medium höher waren als in M9-Medium, kodieren für Zuckertransporter, wobei die Gene CMM_0196 und CMM_0197 die stärkste Änderung der Transkriptmengen zeigten (Tabelle 14). 11 % der Gene in der COG-Gruppe IV kodieren für Regulatoren, 7 % für Resistenzproteine und 3 % für extrazelluläre Proteine (Abbildung 20). Zu den Resistenzgenen zählen zum Beispiel die Gene des Operons CMM_0094-CMM_0096, deren Genprodukte am Energiemetabolismus beteiligt sind. CMM_0094 (*cytA*) kodiert für Cytochrom P450, das zum Beispiel in *R. fasciens* eine Rolle bei der Virulenz des Bakteriums spielt (Healy *et al.*, 2002). Die Transkriptmengen der Gene CMM_2535 (*sbtB*), CMM_1674 (*xysB*) und CMM_0795, die für extrazelluläre Proteine kodieren, waren in XMM-Medium um das 2,6- bis 3,9-fache höher als in M9-Medium. 37 % der Gene, deren mRNA-Level in XMM-Medium höher war als in M9-Medium wurden der COG-Gruppe „unzureichend charakterisiert“ zugeteilt.

Bei Wachstum in XMM-Medium wird somit vor allem das mRNA-Level von Genen erhöht, die für Transporter, vor allem Zuckertransporter, kodieren. Nur für wenige Gene, die für extrazelluläre Proteine kodieren, wurde in XMM-Medium eine zu M9-Medium veränderte Transkriptmenge beobachtet. Von denen für *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* annotierten 46 Genen für extrazelluläre Proteine wurden in den Microarray-Experimenten lediglich vier Gene identifiziert, wovon drei der Gene in XMM-Medium im Vergleich mit M9-Medium eine höhere Transkriptmenge zeigten (Tabelle 14). Wurde die Microarray-Auswertung ohne die Benjamini-Hochberg-Korrektur (Benjamini & Hochberg, 1995) durchgeführt, konnten sieben Gene identifiziert werden, die für extrazelluläre Proteine kodieren und eine veränderte Transkriptmenge zeigten (Daten nicht gezeigt). Neben den drei Genen *sbtB* und *xysB* und CMM_0795 wurden keine weiteren Gene identifiziert, deren Transkriptmengen in XMM-Medium höher waren als in M9-Medium. Es wurden jedoch vier Gene identifiziert, deren mRNA-Level in XMM-Medium niedriger war als in M9-Medium. Diese waren CMM_0053 (*chpC*), CMM_0070 (*sbtA*), CMM_0918 und CMM_2871 (*pgaA*), wobei die Transkriptmengen 3,6-, 3,1-, 1,5- und 5,2-fach niedriger waren (Daten nicht gezeigt). *chpC* und *sbtA* kodieren für Serinproteasen, CMM_0918 für eine Phosphohydrolase und *pgaA* für eine Polygalacturonase.

Die Transkriptmengen der meisten Gene, die für extrazelluläre Proteine kodieren, waren in XMM-Medium im Vergleich zu M9-Medium nicht verändert. Die Transkriptmengen einiger Avirulenzgene in *P. syringae* waren in Minimalmedium mit einer Kohlenstoffquelle höher als in Vollmedium (Innes *et al.*, 1993). Minimalmedium war in diesem Fall ausreichend, um die Expression bestimmter Virulenzgene zu verändern. In weiteren Microarray-Experimenten wurden deshalb die Transkriptmengen in XMM-Medium und in Vollmedium (TBY) verglichen, um die Annahme zu überprüfen, dass schon Minimalmedium ausreicht, um Virulenzgene zu exprimieren.

4.4.3.2 Vergleich: synthetisches Medium (XMM) und Vollmedium (TBY)

Bei einem Vergleich des mRNA-Levels von *Cmm*382-Genen in XMM- und TBY-Medium waren die Transkriptmengen von 239 Genen in XMM-Medium höher als in TBY-Medium und die von 251 Genen niedriger. Die prozentuale Verteilung dieser Gene zu den COG-Gruppen ist in Abbildung 21 dargestellt.

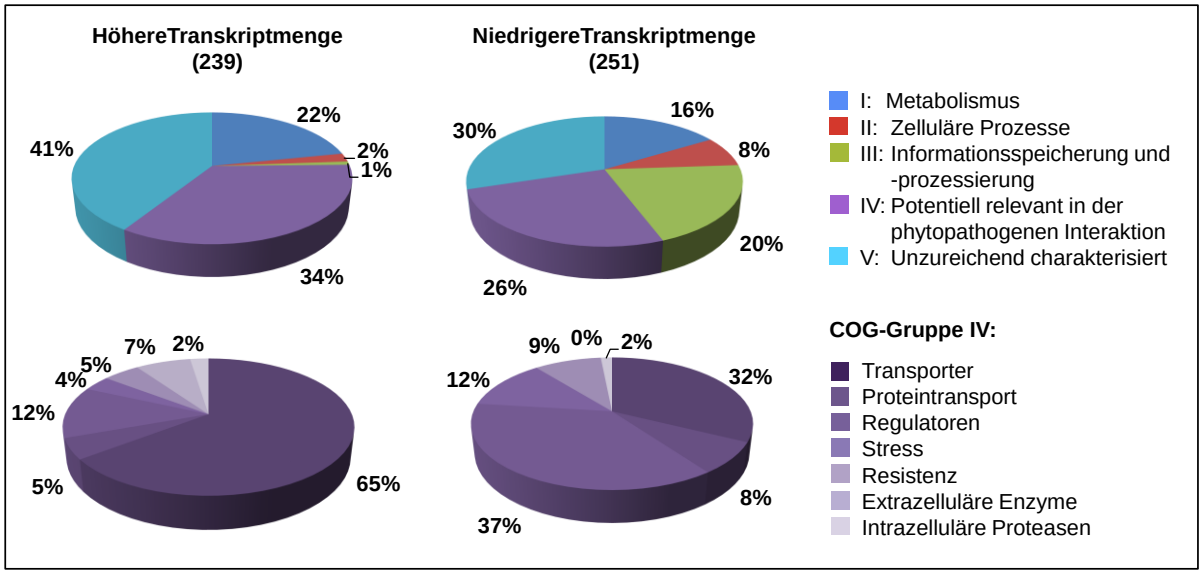


Abbildung 21: Prozentuale Zuordnung der *Cmm*382-Gene aus DNA-Microarray-Experimenten, deren Transkriptmengen in XMM-Medium höher bzw. niedriger waren als in TBY-Medium. Das mRNA-Level von 239 Genen war in XMM-Medium höher, das von 251 Genen niedriger als in TBY-Medium. Dargestellt sind die COG-Hauptgruppen sowie die COG-Gruppe IV.

34 % der Gene, deren Transkriptmengen in XMM-Medium höher als in TBY-Medium waren, wurden der COG-Gruppe IV zugeteilt. 65 % dieser Gene kodieren für Transporter, 12 % für Regulatoren, 5 % für Resistenzproteine und 7 % für extrazelluläre Enzyme. Der Faktor lag bei diesen sechs Genen, die für extrazelluläre Enzyme kodieren, zwischen 1,4 und 3,9 (Daten nicht gezeigt). Neben den Genen *sbtB, xysB* und CMM_0795, die auch schon im Vergleich XMM- mit M9-Medium identifiziert worden waren, waren die Transkriptmengen der Gene

CMM_1948 (*ppaI*), CMM_0090 (*tomA*) und CMM_0043 (*pelA1*) in XMM-Medium höher als in TBY-Medium. Der Unterschied der Transkriptmengen betrug jedoch lediglich zwischen 1,4 und 1,6 (Daten nicht gezeigt). Ohne die Durchführung der Benjamini-Hochberg-Korrektur (Benjamini & Hochberg, 1995) wurden zusätzlich die Gene CMM_1942 (*ppaG*), CMM_1947 (*ppaH*) und CMM_1480 (*expA*) identifiziert, deren Transkriptmengen in XMM-Medium 14-16 Mal höher waren als in TBY-Medium (Daten nicht gezeigt).

Das Microarray-Experiment I (XMM- gegen M9-Medium) wurde mit dem Microarray-Experiment II (XMM- gegen TBY-Medium) vergleichen, um zu überprüfen, ob und wie viele Gene in beiden Vergleichen auftauchten und eine ähnliche Änderung der Transkriptmenge zeigten.

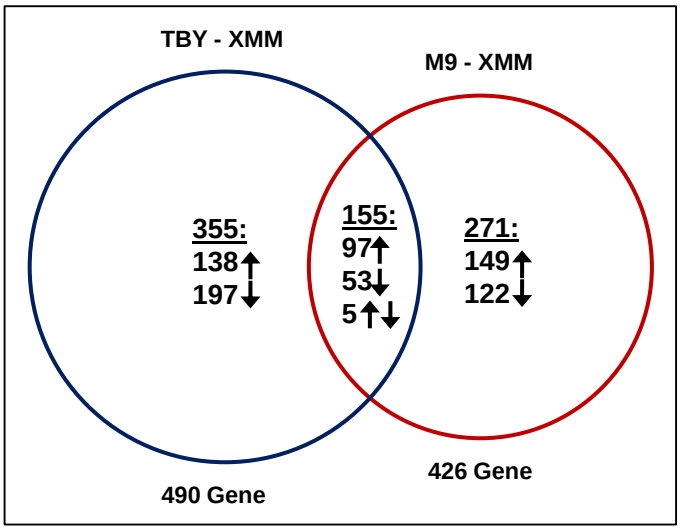


Abbildung 22: Vergleich der Microarray-Experimente mit der isolierten RNA aus einer *Cmm*382-Kultur in TBY- und XMM-Medium sowie in M9- und XMM-Medium. Die Transkriptmengen von 155 Genen waren in beiden Vergleichen verändert. Davon war das mRNA-Level von 97 Genen in XMM höher als in TBY-Medium und das von 53 Genen niedriger. Die Transkriptmengen von fünf Genen waren in beiden Vergleichen unterschiedlich. 355 Gene wurden nur im Vergleich TBY-XMM identifiziert, 271 nur im Vergleich M9-XMM.↑: erhöht, ↓: erniedrigt.

155 Gene zeigten in beiden Experimenten veränderte Transkriptmengen (Abbildung 22). Die Transkriptmengen von 150 Genen waren dabei in beiden Experimenten in XMM-Medium entweder höher oder niedriger als im Vergleichsmedium. Fünf Gene, deren Transkriptmengen im Experiment I zum Beispiel in XMM-Medium höher waren als in M9-Medium waren im Experiment II in XMM-Medium niedriger als in TBY-Medium. 355 Gene wurden nur im Experiment I identifiziert, 271 Gene nur im Experiment II (Abbildung 22).

In Minimalmedium werden somit zum Teil andere Gene exprimiert als in Vollmedium. Im direkten Vergleich des mRNA-Levels in Minimal- und Vollmedium wurden jedoch nur wenige putative Virulenzgene identifiziert, deren Transkriptmengen in Minimalmedium um das

höchstens 6-fache höher waren als in TBY-Medium (Daten nicht gezeigt). Dazu gehörten zum Beispiel die Gene *ppaC* und *chpF*, die für Serinproteasen kodieren sowie die Gene *pelA1* und *pelA2*, die für Pektat-Lyasen kodieren. In dieser Arbeit wurde somit nicht beobachtet, dass Minimalmedium ausreicht, um eine deutliche Veränderung der Transkriptmengen wichtiger Virulenzgene in *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* hervorzurufen.

4.4.3.3 Vergleich: synthetisches Medium (XMM) mit und ohne Acetosyringon

In vorherigen Experimenten wurden nur für wenige Virulenzfaktoren von *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* veränderte Transkriptmengen in XMM-Medium festgestellt. Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass die Zusammensetzung des XMM-Mediums nicht ausreichte, um einer veränderte Genexpression auszulösen. Der Zusatz bestimmter Substanzen zu dem Medium könnte jedoch eine Expressionsänderung Substanz-spezifischer Gene zur Folge haben. In *A. tumefaciens* dient die phenolische Substanz Acetosyringon als Signal für die Expression von Virulenzgenen und wird bei einer Verwundung der Pflanze nach außen abgegeben (Engström *et al.*, 1987; Baker *et al.*, 2005). Um die mögliche Rolle von Acetosyringon in der Virulenzgenregulation von *Cmm*382 zu überprüfen, wurden in dieser Arbeit erneut Microarray-Experimente durchgeführt. Dem Xylemsaft-imitierenden Medium XMM wurden dabei 20 µM Acetosyringon (AS) (M. Thran, Universität Erlangen-Nürnberg, mündliche Mitteilung, 2012) zugefügt. Anschließend wurden die Transkriptmengen in den Medien XMM und XMM + AS verglichen. Abbildung 23 zeigt die prozentuale Zuordnung der Gene, die eine veränderte Transkriptmenge zeigten, zu den einzelnen COG-Gruppen.

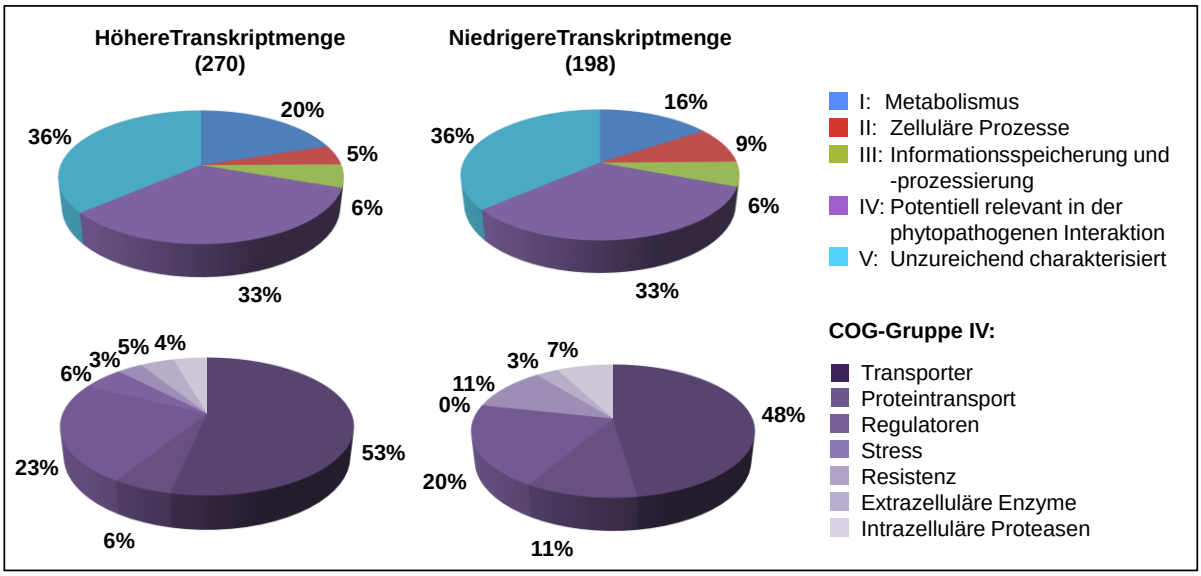


Abbildung 23: Prozentuale Zuordnung der *Cmm*382-Gene aus DNA-Microarray-Experimenten, deren mRNA-Level in XMM-Medium + Acetosyringon (AS) höher bzw. niedriger war als in XMM-Medium. Die Transkriptmengen von 270 Genen waren in XMM-Medium + AS höher, die von 198 Genen niedriger als in XMM-Medium. Dargestellt sind die COG-Hauptgruppen sowie die COG-Gruppe IV.

Die Gene, die in XMM-Medium + AS im Vergleich mit XMM-Medium die größte Änderung der Transkriptmenge zeigten, sind in Tabelle 15 aufgeführt. Eine Liste aller Gene mit einer veränderten Transkriptmenge befindet sich im Anhang (7.4 Tabelle 29 und Tabelle 30).

Tabelle 15: Eine Auswahl der mittels Microarray identifizierten *Cmm*382-Gene, deren Transkriptmengen in XMM-Medium + Acetosyringon (AS) höher oder niedriger waren als in XMM-Medium. Angegeben sind die COG-Gruppen der Gene und die absolute Änderung der Transkriptmenge (*fold change absolute*: FCA), die für niedrigere Transkriptmengen als negativer Wert angegeben ist.

COG-Gruppe	Gen-Name	FCA	Mögliche Funktion
I.1	CMM_1542 (*cydB*)	11,7	*cytochrome bd-type menaquinol oxidase, subunit II*
I.1	CMM_0883 (*bglJ*)	18,3	*cytochrome bd-type menaquinol oxidase, subunit I*
I.2	CMM_2898 (*aldA*)	14,7	*L-alanine dehydrogenase*
IV.1	CMM_2771	13,3	*multidrug ABC transporter, permease component*
IV.1	CMM_0732	14,8	*MFS permease*
IV.1	CMM_2772	19,0	*multidrug ABC transporter, ATPase*
IV.1	CMM_2878	25,6	*citrate transporter, CitMHS family*
V.2	CMM_1138	10,0	*conserved hypothetical protein*
V.2	CMM_0235	10,7	*conserved secreted protein, putative bacteriocin*
V.2	CMM_1249	11,0	*hypothetical secreted protein*
V.2	CMM_2774	27,9	*conserved hypothetical protein*
V.2	CMM_2775	29,9	*conserved hypothetical protein*
V.2	CMM_1921	29,5	*hypothetical secreted protein*
V.2	CMM_2776	39,5	*hypothetical protein*
V.2	pCM2_0036	-11,9	*similar to LSR2 protein*

Die Transkriptmengen von 270 Genen waren in XMM-Medium + AS im Vergleich zu XMM-Medium ohne Zusatz höher, die von 198 Genen waren niedriger (Abbildung 23). Die Funktion von jeweils 36 % der Genprodukte ist unzureichend charakterisiert. Sie scheinen jedoch in der Acetosyringon-vermittelten Genexpression eine Rolle zu spielen. In der COG-Gruppe IV waren die Transkriptmengen von ungefähr ebenso vielen Transporter- und Regulatorgenen höher wie niedriger. Die Regulatorgene kodieren dabei zum Beispiel für Transkriptions-regulatoren der Familien TetR, Cro/CI, MarR, DeoR und ArsR. Für einige Regulatoren dieser Familien ist bekannt, dass sie in der Pathogenität involviert sind (Bonas *et al.*, 2000; Haghjoo & Galán, 2007; Wei *et al.*, 2007). Außerdem waren die Transkriptmengen von Genen höher, die für Kinasen und Antwort-Regulatoren von Zwei-Komponenten-Systemen kodieren (siehe Abschnitt 7.4, Tabelle 31). Die Transkriptmengen dieser Gene waren jedoch in XMM-Medium + AS nur höchstens um den Faktor 2,4 höher als in XMM-Medium ohne Zusatz. Die Zugabe von 20 µM Acetosyringon zu dem Xylemsaft-imitierenden Medium führte insgesamt zu einer

Veränderung der Transkriptmengen einiger Gene. Eine deutliche Regulation bekannter Virulenzgene fand jedoch nicht statt. Die Transkriptmengen einiger Gene, die für Transkriptionsregulatoren kodieren waren jedoch in XMM-Medium + AS verändert. Diese könnten für die Expressions-Regulation putativer Virulenzgene wichtig sein.

4.5 Charakterisierung und Analyse von Transkriptionsregulatoren

Die Abhängigkeit der Expression möglicher Virulenzgene von dem verwendeten Wachstumsmedium wurde in Transkriptomanalysen in dieser Arbeit gezeigt. Bei der Interaktion des Bakteriums mit der Tomatenpflanze sind Transkriptionsregulatoren wichtig, um auf ein Signal hin das Level der Genexpression zu verändern. Das regulatorische Netzwerk, das nötig ist, um die Genexpression auf die Bedingungen im Xylemsaft umzustellen, scheint sehr komplex zu sein (Flügel *et al.*, 2012). Flügel und Kollegen konnten 108 Gene identifizieren, die für Regulatoren kodieren und bei Kontakt mit der Pflanze ein höheres oder niedrigeres Transkript-Level zeigten als in dem Wachstum *in vitro* (Flügel *et al.*, 2012). Savidor und Kollegen bestätigten mittels Proteomanalysen die wichtige Rolle von Transkriptionsregulatoren in der Wirt-Pathogen-Interaktion (Savidor *et al.*, 2012). Die beiden am besten charakterisierten Virulenzfaktoren sind die Cellulase CelA (Jahr *et al.*, 2000) und die Serinprotease Pat-1 (Dreier *et al.*, 1997). Die Transkriptionsregulatoren für *pat-1* und *celA* wurden jedoch bis jetzt nicht untersucht. In dieser Arbeit wurden mit Hilfe von Bindungsexperimenten mögliche Transkriptionsfaktoren dieser beiden Gene identifiziert und drei ausgewählte Kandidaten analysiert.

4.5.1 Charakterisierung von Regulatoren für *pat-1* und *celA*

Für die Identifizierung möglicher Transkriptionsfaktoren von *celA* und *pat-1* wurden Bindungsexperimente durchgeführt. Dabei wurden 500 bp-Fragmente der 5'-Regionen beider Gene mit Biotin markiert und über die Strep-Tactin-Biotin-Interaktion an *magnetic beads* gekoppelt. Der Proteinextrakt aus einer *Cmm*382-Kultur wurde anschließend zu den *magnetic beads* gegeben und die spezifisch an die Promotorregionen gebundenen Proteine wurden mittels NaCl-Gradienten eluiert. Die Bakterien wurden in M9-, XMM- und XVM2-Medium (Wengelnik *et al.*, 1996) kultiviert, um auch Transkriptionsregulatoren zu erhalten, die nur medienabhängig aktiv sind. Die Proteine der neun Elutionsfraktionen wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt. In Abbildung 24 wurden jeweils die neun Elutionsfraktionen der Proteine auf SDS-Gelen aufgetrennt, die an die Promotorregion von *pat-1* gebunden hatten. Das Bandenmuster nach der Bindung an die Promotorregion von *celA* war vergleichbar (Daten nicht gezeigt). Auf den SDS-Gelen wurden zahlreiche Proteinfragmente eluiert, die spezifisch

an die Promotorregionen gebunden hatten. Bei AmtR-Bindungsexperimenten mit dem Proteinextrakt aus *C. glutamicum* waren im Gegensatz dazu jeweils nur etwa drei Proteinbanden auf den Gelen zu erkennen (Amon *et al.*, 2008). Zum einen wurden somit in dieser Arbeit vermutlich einige unspezifisch gebundene Proteine eluiert, zum anderen wurde für 19 Gene des Genoms von *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* eine Funktion als DNA-Bindeprotein vorhergesagt (http://cmr.jcvi.org). Diese 19 Proteine hatten vermutlich ebenfalls an die Promotorregionen von *pat-1* und *celA* gebunden, obwohl sie keine Regulatorfunktion besitzen.

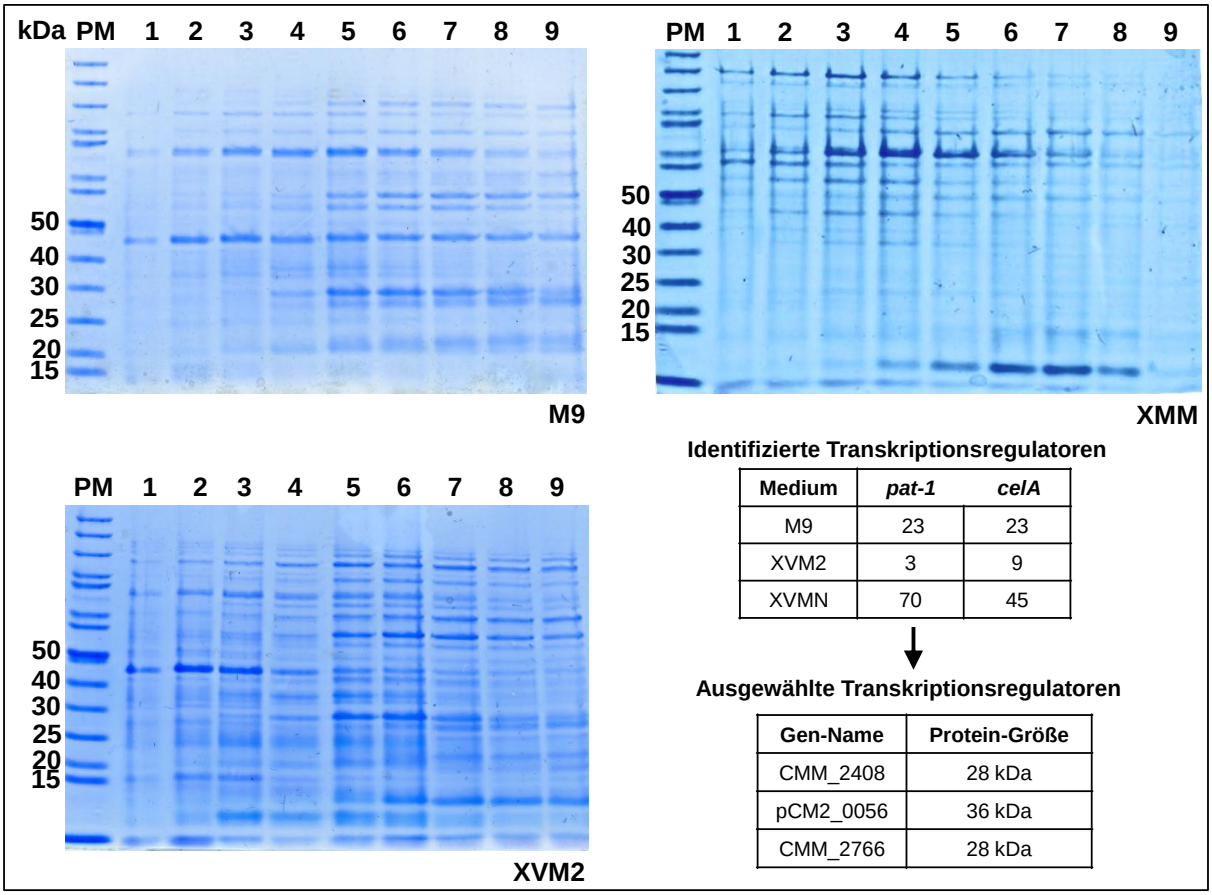


Abbildung 24: Analyse und Identifizierung putativer Transkriptionsregulatoren von *celA* und *pat-1*. Mit den spezifisch an die Promotorregionen von *celA* und *pat-1* gebundenen und eluierten Proteinen wurde eine SDS-PAGE durchgeführt. PM: Proteinmarker II; Spuren 1-9: Elutionsfraktionen 1-9 (steigende NaCl-Konzentration). Exemplarisch sind nur die Gele mit den eluierten Proteinen für *pat-1* gezeigt. Die Gele von *celA* waren vergleichbar. Ausgewählte Proteinfragmente zwischen 10 und 50 kDa wurden mittels MALDI-ToF MS analysiert und drei ausgewählte Transkriptionsregulatoren weiter verwendet.

Aufgrund der unterschiedlich starken Konzentration der Proteinfragmente auf den SDS-Gelen der drei Medien M9, XMM und XVM2 war es nicht möglich, Unterschiede im Bandenmuster zu erkennen. Aus diesem Grund wurden spezifische Proteinbanden aus den Gelen ausgeschnitten und die darin enthaltenen Proteine mittels MALDI-ToF MS analysiert. Die

Größe von Transkriptionsregulatoren variiert zwischen 15 und 40 kDa (Henikoff *et al.*, 1988; Seoane & Levy, 1995; Amon *et al.*, 2008). Für die Analyse wurden deshalb nur Proteine zwischen 10 kDa und 50 kDa ausgewählt. Jede analysierte Proteinbande lieferte 3-78 verschiedene Proteine. Aus diesen wurden die Proteine ausgewählt, deren mögliche Funktion die Regulation der Transkription ist (vgl. Abbildung 24). Insgesamt wurden in den drei Medien M9, XMM und XVM2 76 solcher Proteine in Bindungsexperimenten mit der Promotorregion von *pat-1* identifiziert und 58 für die Promotorregion von *celA,* wobei 70 % der Proteine an beide Promotorregionen gebunden hatten (siehe Abschnitt 7.5, Tabelle 31). Drei dieser Regulatoren wurden für weiterführende Studien ausgewählt (Abbildung 24). CMM_2408 kodiert für einen Transkriptionsregulator der IclR-Familie. Regulatoren dieser Familie binden als ein Dimer oder zwei Dimere an die 5‘-Region von Genen, die unter anderem an der Pathogenität von Phytopathogenen beteiligt sind (Molino-Henares *et al.*, 2006). Das Genprodukt von CMM_2408 wurde nach der Bindung der Proteinextrakte in allen drei Medien von der Promotorregion von *pat-1* eluiert und in zwei der Medien auch von der Promotorregion von *celA*. pCM2_0056 wurde aufgrund der Lokalisation in der Nähe von *pat-1* (pCM2_0054) ausgewählt. Das entsprechende Genprodukt konnte von den Promotorregionen von *pat-1* und *celA* eluiert werden, wenn der Proteinextrakt aus einer XMM-Kultur verwendet wurde. CMM_2766 kodiert für den Antwortregulator eines Zwei-Komponentensystems und ist mit CMM_2765, das für eine Sensor-Histidin-Kinase kodiert, in einem Operon lokalisiert (http://cmr.jcvi.org). Proteine eines Zwei-Komponenten-Systems sind ebenfalls an der Regulation von Virulenzgenen beteiligt (Karki *et al.*, 2012). Das Genprodukt von CMM_2766 wurde von den Promotorregionen von *pat-1* und *celA* eluiert, wenn der Proteinextrakt aus einer XMM- bzw. XVM2-Kultur verwendet wurde.

4.5.2 Insertionsmutagenese von drei putativen Regulatoren

Die drei Gene CMM_2408, CMM_2766 und pCM2_0056 sollten in dieser Arbeit mittels Insertionsmutagenese ausgeschaltet werden, um zu überprüfen, ob deren Genprodukte einen Einfluss auf die Expression von *pat-1* und *celA* haben. Jahr und Kollegen sowie Stork und Kollegen führten die Mutation von *celA*, *chpC* und *chpG* durch die Insertion einer Resistenzkassette durch (Jahr *et al.*, 2000; Stork *et al.*, 2008). Die Insertion erfolgte durch doppelt-homologe Rekombination. In dieser Arbeit war jedoch die Herstellung von Insertionsmutanten durch doppelt-homologe Rekombination nicht erfolgreich. Die Insertionsmutagenese wurde deshalb durch einfach-homologe Rekombination durchgeführt. Der Vektor pUC18 kann in *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* nicht repliziert werden, sodass er in das Genom integriert werden muss. In pUC18*cat* wurden je 300-500 bp große Fragmente der Zielgene eingefügt. Nach der Elektroporation von *Cmm*382 mit pUC18*cat*, der das

entsprechende Zielfragment enthielt, konnten Bakterien, die den Vektor in das Genom integriert hatten, auf TBY-Platten mit Chloramphenicol selektiert werden. Die korrekte Insertion der entsprechenden Plasmide in den Zielgen-Leserahmen wurde mittels DNA-Hybridisierung analysiert. Eine graphische Darstellung der Lokalisation der Gene CMM_2408, CMM_2766 und pCM2_0056 im Genom des Wildtypstammes und der Mutantenstämme ist in Abbildung 25 dargestellt.

Für die Durchführung der DNA-Hybridisierungsexperimente wurde eine 370-450 bp lange Sonde hergestellt, welche an das 5‘-Ende der Zielgene und an einen Teil der 5‘-Region bindet. Ein Sondentest bestätigte die Markierung der Sonden mittels Digoxigenin im Vergleich mit einer Digoxigenin-markierten Kontroll-DNA (Abbildung 25). Die DNA-Hybridisierung wurde mit der DNA des Wildtypstammes und der von fünf bis sechs möglichen Mutantenstämmen durchgeführt, die auf TBY-Platten eine Chloramphenicol-Resistenz aufwiesen. In Abbildung 25 ist das Wildtyp- und das mutierte Gen dargestellt sowie die erwarteten DNA-Fragmente in DNA-Hybridisierungsexperimenten. Die Mutantenstämme wurden EH2408, EH2766 und EH0056 bezeichnet.
Für die Überprüfung der Insertion in CMM_2408 wurden Wildtyp- und EH2408-DNA mit den Enzymen BglII und NotI geschnitten. Nach der Hybridisierung der spezifischen CMM_2408-Sonde (schwarzer Balken, Abbildung 25, links) an die geschnittene DNA und der Detektion der Digoxigenin-Markierung der Sonde war jeweils ein DNA-Fragment auf der Membran zu erkennen (Abbildung 25, A, rechts). Das DNA-Fragment war im Wildtypstamm 2.500-2.600 bp groß, im Stamm EH2408 zwischen 7.400 und 8.500 bp. Die Größen stimmten mit den theoretisch ermittelten Größen (2.494 bp und 7.458 bp) überein.
Für die Überprüfung der Insertion in CMM_2766 wurden Wildtyp- und EH2766-DNA mit dem Enzym PmlI geschnitten (Abbildung 25, B). Die detektierten DNA-Fragmente nach Hybridisierung der CMM_2766-Sonde betrugen im Wildtypstamm etwa 3.400 bp, im Stamm EH2766 etwa 4.000 bp. Die Größen stimmten mit den theoretisch ermittelten Werten (3.412 bp und 3.980 bp) überein. In beiden Stämmen wurde zusätzlich ein etwa 2.800 bp großes Fragment detektiert. Mittels *in silico*-Analyse wurde untersucht, ob die Sonde CMM_2766 an einer anderen Stelle an die Sequenz des Genoms von *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* bindet. Es wurde jedoch lediglich eine Bindung an die CMM_2766-Region festgestellt. Eine Erklärung für das zweite detektierte Fragment wurde nicht gefunden.

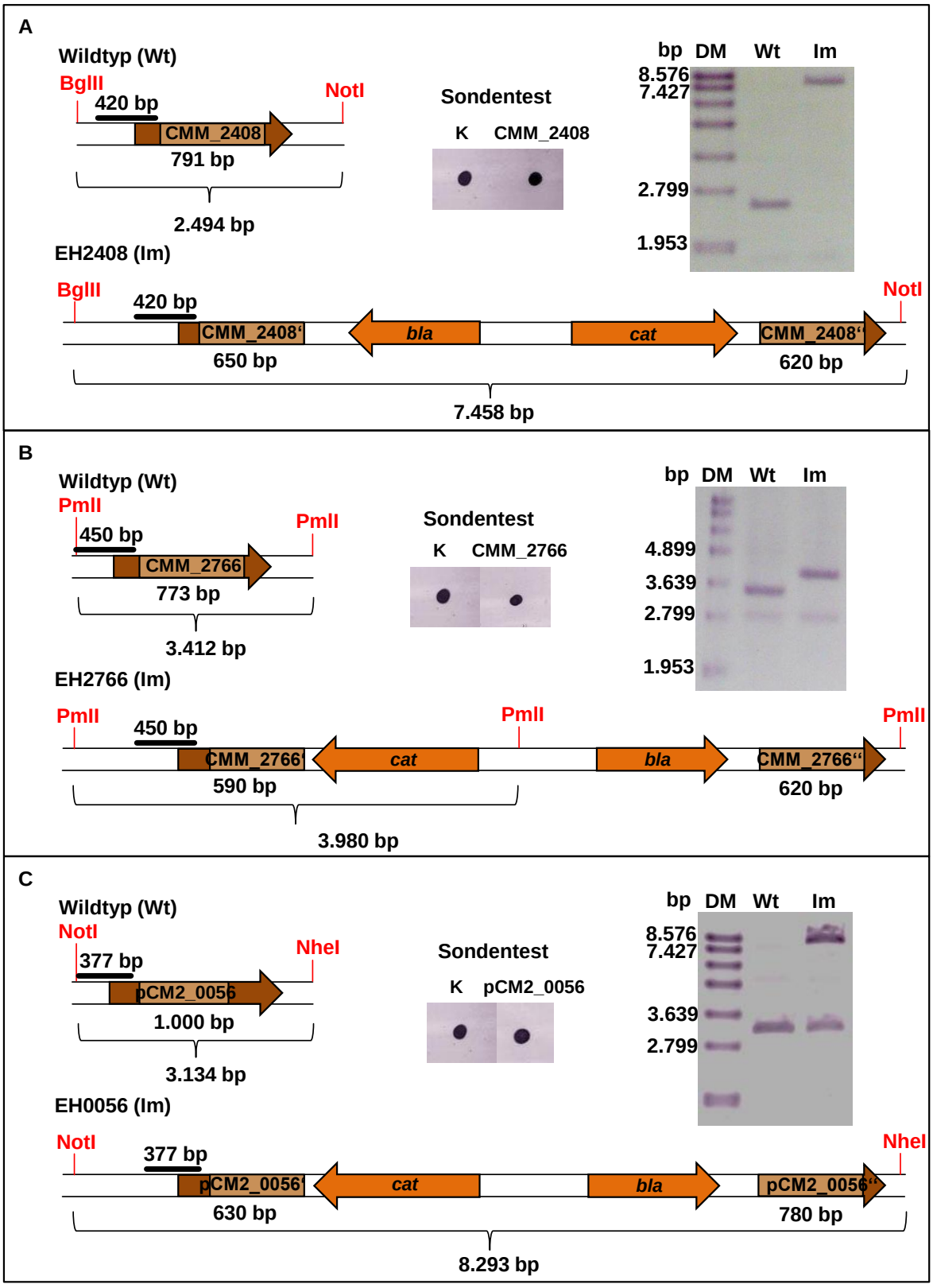


Abbildung 25: DNA-Hybridisierungsexperimente zur Überprüfung der Insertion von pUC18*cat* mit dem entsprechenden Zielgenfragment in CMM_2408, CMM_2766 und pCM2_0056. Schematische Darstellung des Wildtyp-Gens und des mutierten Gens (Insertionsmutante Im). Die entsprechenden Sonden wurden mittels Sondentest analysiert, K: DIG-markiertes DNA-Fragment als Kontrolle. Die DNA-Hybridisierung wurde mit dem DNA-Marker VII (DM, Roche, Mannheim), der Wildtyp-DNA (Wt) und der Insertionsmutanten-DNA (Im) durchgeführt.

Für die Überprüfung der Insertion in pCM2_0056 wurden Wildtyp- und EH0056-DNA mit den Enzymen NotI und NheI geschnitten (Abbildung 25, C). Mit Hilfe einer Kontroll-PCR wurde bestätigt, dass nach der Isolierung der chromosomalen DNA neben dieser auch die natürlichen Plasmide pCM1 und pCM2 isoliert wurden (Daten nicht gezeigt). Nach der Hybridisierung der pCM2_0056-Sonde war im Wildtypstamm ein etwa 3.100 bp großes Fragment auf der Membran zu erkennen. Im Stamm EH0056 wurde neben einem 8.000-8.500 bp großen Fragment auch das Wildtyp-Fragment detektiert. Die theoretisch ermittelten Größen lagen für das Wildtyp-Fragment bei 3.134 bp und für das EH0056-Fragment bei 8.293 bp. Die Größen stimmten mit den detektierten Fragmentgrößen überein. Dass neben dem etwa 8.000 bp großen Fragment auch das Wildtyp-Fragment detektiert wurde, könnte mit einer Integration des Plasmids an einer anderen Stelle im Genom erklärt werden. Bei einer *in silico*-Analyse wurde CMM_0055 als ein zu pCM2_0056 homologes Gen auf dem Chromosom identifiziert, wobei die Sequenzen zu 100 % identisch waren (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sutils/genom_tree.cgi). Insgesamt gab es eine 98%ige Übereinstimmung einer 2.198 bp-umfassenden homologen Region, die auf pCM2 die Gene pCM2_0055 und pCM2_0056 enthält und auf dem Chromosom die Gene CMM_0054 und CMM_0055 (Abbildung 26).

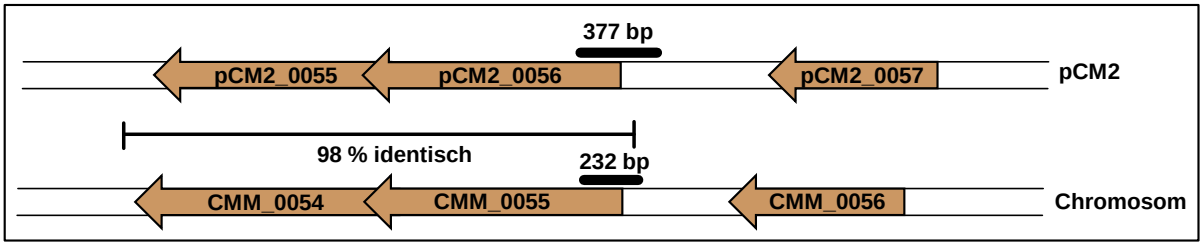


Abbildung 26: Graphische Darstellung der homologen Sequenzen von pCM2_0056 und CMM_0055. Eine 2198 bp umfassende Region auf dem Chromosom ist zu 98 % identisch mit einer Region auf pCM2, darunter die Gene pCM2_0055 und pCM2_0056. Die Sequenzen von pCM2_0056 und CMM_0055 stimmen zu 100 % überein. Die pCM2_0056-Sonde bindet zu 62 % an CMM_0055 und die entsprechende 5‘-Region.

Die pCM2_0056-Sonde bindet zu 62 % an CMM_0055 und die entsprechende 5‘-Region, wodurch die Überprüfung der richtigen Insertion des Plasmids in den offenen Leserahmen von pCM2_0056 erschwert wird. In weiteren Experimenten wurde versucht, eine pCM2_0056/CMM_0055-Doppelmutante herzustellen, was jedoch nicht erfolgreich war. Es konnte somit in dieser Arbeit keine pCM2_0056-Insertionsmutante hergestellt werden.

Neben der *in silico*-Analyse von pCM2_0056 wurde die gesamte Sequenz von pCM2 mit der des Chromosoms verglichen und es wurde eine 24%ige Identität festgestellt (Tabelle 16).

Tabelle 16: Sequenzhomologien zwischen pCM2 und dem Chromosom. Sequenzhomologien zwischen pCM2 und Abschnitten des Chromosoms betrugen 82 und 98 % (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sutils/genom_tree.cgi). Die Gene der entsprechenden Regionen sind mit aufgeführt. hp: hypothetisches Protein.

Identität	Lokalisation auf pCM2	Lokalisation auf dem Chromosom
98 %	60.436 - 62.634 pCM2_0055: 61.455 - 60.511 (hp) pCM2_0056: 62.452 - 61.448 (Regulator)	76.528-78.724 CMM_0054: 77.545 - 76.541 (hp) CMM_0055: 78.542 - 77.538 (hp)
95 %	65.752 - 68.502 pCM2_0061: 66.023 - 66.310 (hp) pCM2_0062: 66.549 - 66.364 (hp) pCM2_0063: 66.933 - 66.598 (hp) pCM2_0064: 67.041 - 67.535 (hp) pCM2_0065: 67.655 - 67.864 (hp)	83.803 - 86.549 CMM_0060: 85.126 - 85.584 (hp) CMM_0061: 85.938 - 86.894 (*filamentation protein*)
93 %	62.846 - 63.702 pCM2_0057: 63.216 - 63.833 (hp)	78.724 - 79.586 CMM_0056: 79.094 - 70756 (hp)
93 %	1 - 1.644 pCM2_0001: 1 - 1539 (hp)	87.336 - 88.990 CMM_PS_09 (*parB2*): 87.336 - 88.883
92 %	69.618 - 69.989 pCM2_0069: 69.586 - 69.903 (hp)	86.995 - 87.335
92 %	64.620 - 64.836	82.207 - 82.421
91 %	68.574 - 68.902 pCM2_0066: 67.890 - 68.732 (hp) pCM2_0067: 69.233 - 68.844 (hp)	86.623 - 86.949
91 %	3.278 - 4.910 pCM2_0003: 2.421 - 3.329 (hp) pCM2_0004: 3.847 - 3.966 (hp)	90.318 - 91.963 CMM_0062: 91.403 - 91.792 (hp)
90 %	63.046 - 63.692 pCM2_0057: 63.216 - 63.833 (hp)	47.719 - 48.361 CMM_0038: 47.879 - 48.292 (hp)
90 %	65.010 - 65.479 pCM2_0059: 64.866 - 65,033 (hp) pCM2_0060: 65.036 - 65.257 (hp)	112.142 - 112.613 CMM_0074: 112.168 - 112.389 (hp)
88 %	46.413 - 48.829 pCM2_0044: 46.277 - 46,672 (hp) pCM2_0045: 46.761 - 46,916 (hp) pCM2_0046: 46.969 - 47.142 (hp) pCM2_0047: 48,534 - 47.770 (hp)	55.703 - 58.103 CMM_0045: 57.396 - 57.043 (hp)
88 %	2.244 - 2.402	87.162 - 87.318
87 %	54.757 - 56.568 pCM2_0054 (*pat-1*): 55.371 - 56.213	58.308 - 60.109 CMM_PS_05 (*chpA*): 58.928 - 59.730
87 %	53.524 - 54.031 pCM2_0053 (*phpA*): 53.465 - 54.298	58.987 - 59.495 CMM_PS_05 (*chpA*): 58.928 - 59.730
84 %	56.720 - 57.860	60.140 - 61.283
82 %	63.332 - 63.579 pCM2_0057: 63.216 - 63.833 (hp)	49.906 - 50.149 CMM_0040: 49.775 - 50.104 (hp)
82 %	5.105 - 6.055 pCM2_0006: 4.742 - 5.263 (hp) pCM2_0007: 5.260 - 6.033 (hp)	91.974 - 92.897 CMM_0063: 92.168 - 92.875 (hp)

Die Sequenzhomologien umfassen eine Länge zwischen 200 und 2.400 bp und sind zwischen 82 und 98 % identisch. Die Regionen auf dem natürlichen Plasmid pCM2 und auf dem Chromosom, die homolog zueinander sind, sind in Tabelle 16 aufgeführt sowie, wenn vorhanden, die entsprechenden Gene. Wenn in den homologen Regionen Gene lokalisiert sind, kodieren diese in den meisten Fällen für hypothetische Proteine. Es wurden jedoch auch Sequenzhomologien zwischen den Genen der Serinproteasen *pat-1* und *chpA* sowie *phpA* und *chpA* identifiziert.

4.5.3 Analyse der Mutation von CMM_2408 und CMM_2766

Um eine mögliche Änderung der Transkriptmengen der beiden Virulenzgene *celA* (Cellulase) und *pat-1* (Serinprotease) bei Abwesenheit eines der beiden Transkriptionsregulator-Gene CMM_2408 bzw. CMM_2766 zu überprüfen, wurden RNA-Hybridisierungsexperimente durchgeführt. Die verwendete RNA wurde aus den Stämmen *Cmm*382, EH2408 und EH2766 isoliert, wobei die Stämme in Vollmedium (TBY), Minimalmedium (M9) und Xylemsaft-imitierendem Medium (XMM) kultiviert wurden. Mit Hilfe spezifischer RNA-Sonden wurde die RNA der Gene *gapA*, *pat-1* und *celA* detektiert (Abbildung 27).

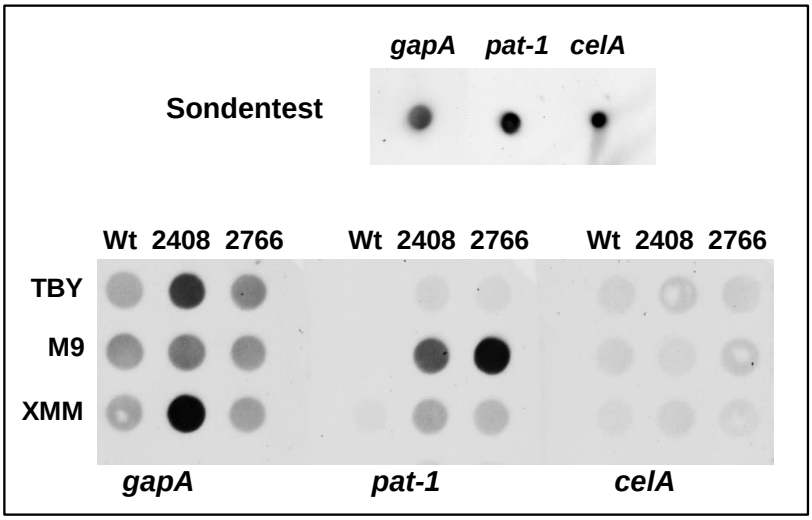


Abbildung 27: RNA-Hybridisierungs-Experiment. Die Gesamt-mRNA wurde aus den Stämmen *Cmm*382 (Wt), EH2408 (2408) und EH2766 (2766) isoliert. Die Kultivierung der Stämme wurde in TBY-, M9- und XMM-Medium durchgeführt. Die Detektion erfolgte mit Hilfe spezifischer Sonden gegen die Gene *gapA*, *pat-1* und *celA*, die zuvor mittels Sondentest auf ihre Digoxigenin-Markierung getestet wurden. Nach 30 min wurde das detektierte Signal aufgenommen.

Das Gen *gapA* kodiert für eine Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase, die bei der Glycolyse eine Rolle spielt. *gapA* ist ein *housekeeping* Gen, das konstitutiv exprimiert wird (Butte *et al.*, 2001; Turpin *et al.*, 2012). Im Stamm EH2408 war jedoch in TBY- und XMM-Medium im Gegensatz zu M9-Medium eine erhöhte *gapA*-Transkriptmenge zu erkennen

(Abbildung 27). Der Wildtypstamm und der Stamm EH2766 zeigten in allen drei Medien eine vergleichbare *gapA*-Transkriptmenge. In den Mutantenstämmen EH2408 und EH2766 war die Transkriptmenge von *pat-1* in M9-Medium deutlich höher als in TBY-Medium. Eine leicht erhöhte Transkriptmenge war außerdem in XMM-Medium zu erkennen. Das mRNA-Level von *celA* war in allen drei Stämmen und Medien sehr schwach. Die Transkriptmenge des Virulenzgens *pat-1* war somit nach der Mutation von CMM_2408 oder CMM_2766 in XMM-Medium leicht und in M9-Medium stark erhöht, sodass auf einen Einfluss der Expression von *pat-1* durch die Mutation von CMM_2408 oder CMM_2766 geschlossen werden kann.

Neben RNA-Hybridisierungsexperimenten wurden Wachstumsexperimente in TBY-, M9- und XMM-Medium durchgeführt, um zu überprüfen, ob die Mutantenstämme ein im Gegensatz zum Wildtypstamm verändertes Wachstum zeigten. Die Stämme EH2408 und EH2766 erreichten in allen Medien geringere Zellzahlen als *Cmm*382 (Abbildung 28).

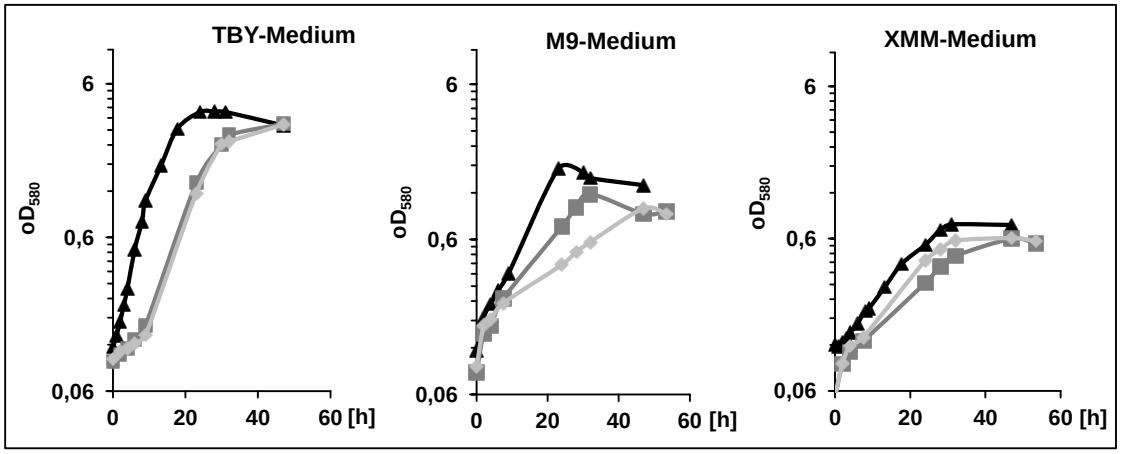


Abbildung 28: Wachstum der Stämme *Cmm*382, EH2408 und EH2766 in den Medien TBY, M9 und XMM. Die Generationszeiten der Stämme betrugen in TBY-Medium 3,7 h (*Cmm*382) und 5,7 h (EH2408, EH2766), in M9-Medium 6,6 h (*Cmm*382), 9,9 h (EH2408) und 17,1 h (EH2766) und in XMM-Medium 10,9 h (*Cmm*382), 12,8 h (EH2408) und 11,0 h (EH2766). Schwarze Dreiecke: *Cmm*382, dunkelgraue Quadrate: EH2408, hellgraue Rauten: EH2766.

Die Generationszeit war im Vergleich zum Wildtyp in TBY-Medium um etwa 54 % geringer, in M9-Medium um 50 % (EH2408) bzw. 160 % (EH2766) geringer und in XMM-Medium um 17,5 % (EH2408) bzw. 1,6 % (EH2766) geringer. Die Mutation von CMM_2408 oder CMM_2766 hatte somit einen leichten Einfluss auf das Wachstumsverhalten der Stämme in TBY- und XMM-Medium. Die Mutante EH2766 war in M9-Medium stark in ihrem Wachstum eingeschränkt, verglichen mit dem Wildtypstamm, bei der Mutante EH2408 war hingegen lediglich eine leichte Beeinflussung des Wachstums zu erkennen.

Zur Analyse der Virulenz der Stämme EH2408 und EH2766 wurden Pflanzeninfektionsversuche durchgeführt, wobei je sieben Pflanzen verwendet wurden. Die Infektion mit dem Wildtypstamm *Cmm*382 diente als Kontrolle. Erste Krankheitssymptome traten nach acht Tagen (*Cmm*382, EH2408) bzw. nach elf Tagen (EH2766) auf. 19 dpi wurden die Krankheitssymptome der infizierten Pflanzen erneut dokumentiert (Abbildung 29).

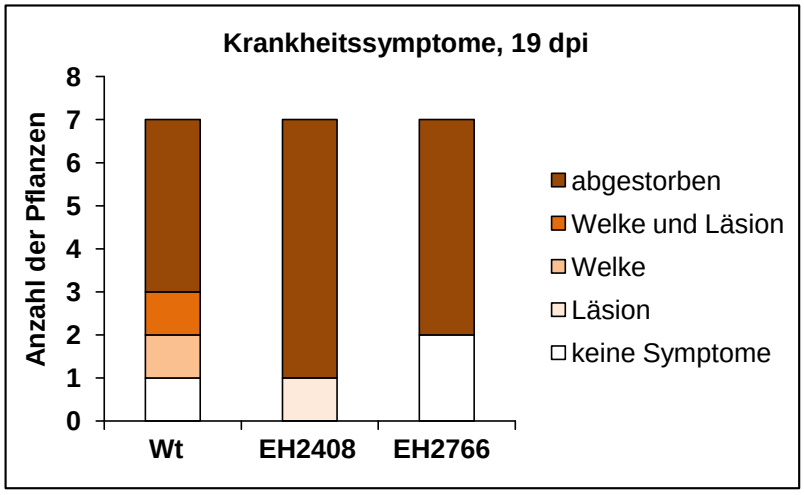


Abbildung 29: Krankheitssymptome, 19 Tage nach der Infektion von Tomatenpflanzen. Insgesamt wurden je sieben Pflanzen über die Wurzeln mit dem Wildtypstamm *Cmm*382 (Wt) und den Insertionsmutanten EH2408 und EH2766 infiziert. Diese zeigten 19 dpi unterschiedliche Krankheitssymptome, wie Blattwelke und Stängelläsion. Ein Großteil der infizierten Pflanzen war zu diesem Zeitpunkt abgestorben.

Eine Infektion mit dem Stamm EH2408 war dabei für 86 % der Pflanzen letal, eine Infektion mit dem Stamm EH2766 für 71 % der Pflanzen und eine mit dem Stamm *Cmm*382 für 57 % der Pflanzen. Keine Krankheitssymptome zeigten zwei Pflanzen, die mit dem Stamm EH2766 infiziert worden waren und eine *Cmm*382-infizierte Pflanze. Das Experiment wurde jedoch aus Zeitgründen nur zwei Mal durchgeführt, wobei die Infektion beim ersten Experiment größtenteils nicht erfolgreich war (Daten nicht gezeigt). Aus diesem Grund konnten keine Aussagen getroffen werden, ob die Mutation der Regulator-Gene eine Auswirkung auf die Virulenz des Bakteriums hatte.

4.6 Promotorstudien

Um zukünftige Regulator-Bindestellen oder Gene eines Regulons identifizieren zu können, deren Expression bei der Wirt-Pathogen-Interaktion reguliert wird, sind Promotoranalysen notwendig. Durch zur Verfügung stehende Konsensus-Sequenzen für Promotorstrukturen wie die -10- und -35-Region sowie die Shine-Dalgarno-Sequenz wird die Analyse noch nicht charakterisierter Promotoren vereinfacht. Promotorstudien wurden bis jetzt nur für die Virulenzgene *pat-1* (Dreier *et al.*, 1997) und *celA* (Jahr *et al.*, 2000) durchgeführt. Eine für

Clavibacter typische Konsensussequenz wurde bis jetzt jedoch nicht identifiziert. Eine größere Verfügbarkeit von Promotorregionen würde zum einen den Einsatz starker Promotoren für molekulare Analysen ermöglichen, zum anderen die Identifizierung von Genen, deren Expression durch den gleichen Transkriptionsregulator gesteuert wird. Aus diesen Gründen wurde in dieser Arbeit zum einen nach starken Promotoren im Genom von *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* gesucht, zum anderen wurden Promotorregionen nach der Durchführung einer RNA-Sequenzierung des 5‘-Transkriptoms analysiert.

4.6.1 Analyse der Promotorregion von *glnA1*

In dieser Arbeit wurden GFP-Fluoreszenzanalysen mit den Promotorregionen einiger Gene durchgeführt, um starke Promotoren im Genom von *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* zu identifizieren. Als Kontrolle wurde die Promotorregion von *pat-1* und dem *housekeeping* Gen *pfkA* (Gunton *et al.*, 2005) verwendet. Wurde der Promotor P45, der als starker Promotor in *C. glutamicum* gilt (Knoppová *et al.*, 2007), in GFP-Messungen eingesetzt, war in den entsprechenden *Clavibacter*-Stämmen keine Fluoreszenz detektierbar (Daten nicht gezeigt). Der Promotor konnte somit von *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* nicht abgelesen werden. Zur Analyse starker Promotoren wurden deshalb die Promotorregionen von zehn Phagengenen im Genom von *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* (http://cmr.jcvi.org; Gartemann *et al.,* 2008) verwendet, da Phagengen-Promotoren effizient sind und eine hohe Stringenz aufweisen (Tabor & Richardson, 1985). Des Weiteren wurde die Promotorregion von *glnA1* auf ihre Expressionsstärke hin getestet. *glnA1* kodiert für eine Glutaminsynthetase und wurde gewählt, da in unabhängigen Experimenten eine erhöhte Expression beobachtet wurde (Daten nicht gezeigt). Die Promotorregionen wurden stromaufwärts von *gfp* in den *E. coli* / *Clavibacter-Shuttle* Vektor pDM302 eingefügt und kompetente *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*-Stämme damit transformiert. Die Bakterienstämme, die pDM302 mit der Promotorregion von *glnA1* (Abbildung 30, A) und dem Phagengen CMM_PS_21 (Daten nicht gezeigt) enthielten, zeigten das stärkste Fluoreszenzsignal.

Beide Promotorregionen wurden an Hand zweier Methoden analysiert. Zum einen wurden sie auf 150 bp verkürzt bzw. auf 250 bp verlängert, um einen Verlust oder eine Steigerung der Fluoreszenz zu überprüfen. Zum anderen wurde eine 5‘-*RACE* durchgeführt, um die Transkriptionsstartpunkte zu identifizieren. Beide Methoden waren nur für die Promotorregion von *glnA1* erfolgreich. Die Fluoreszenzanalysen wurden in Minimalmedium mit und ohne Ammonium durchgeführt, da *glnA1* für eine Glutaminsynthetase kodiert und diese eine wichtige Rolle bei der Ammoniumassimilation in stickstoffarmen Bedingungen spielen (Nolden *et al.*, 2001) (Abbildung 30, B).

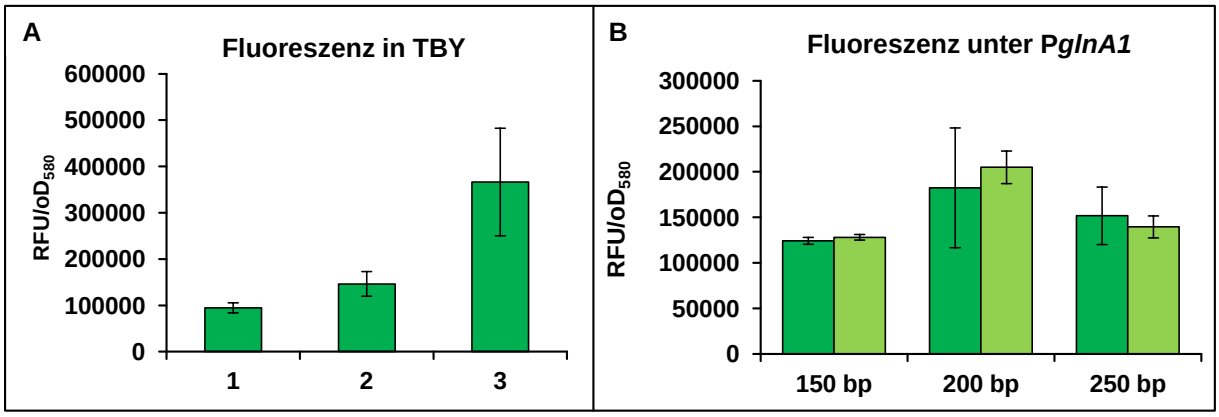


Abbildung 30: GFP-Fluoreszenzmessung. A: Ermittelte Fluoreszenz der Stämme *Cmm*102pDM302P*pfkAgfp* (1), -P*pat-1gfp* (2) und -P*glnA1gfp* (3) nach Wachstum in TBY-Medium. **B:** Ermittelte Fluoreszenz des Stammes *Cmm*102pDM302P*glnA1gfp*, mit der Promotorgröße von 150 bp, 200 bp und 250 bp nach Wachstum in Minimalmedium (dunkelgrün) und Minimalmedium ohne Ammonium (hellgrün).

Sowohl in Minimalmedium (dunkelgrün) als auch in Minimalmedium ohne Ammonium (hellgrün) war eine leicht gesteigerte Fluoreszenz zu erkennen, wenn die Promotorregion von *glnA1* 200 bp umfasste, im Gegensatz zu der um 50 bp kürzeren oder 50 bp längeren Region (Abbildung 30, B). Ein vollständiger Verlust der GFP-Expression war jedoch unter keiner der Promotorregionen zu erkennen. In den 150 Nukleotiden stromaufwärts des *glnA1*-Startcodons sind somit anscheinend alle für eine Transkription wichtigen Sequenzen enthalten.

Die 5‘-Region von *glnA1* (CMM_1636) umfasst 193 bp bis zum Startcodon des folgenden Gens CMM_1637, das, im Gegensatz zu *glnA1*, auf dem Vorwärtsstrang liegt (Abbildung 31, A). Um den exakten Transkriptionsstartpunkt zu identifizieren, wurden 5‘-*RACE*-Experimente durchgeführt. Dazu wurde die Gesamt-mRNA aus einer *Cmm*382-Kultur in M9- und XMM-Medium verwendet. In beiden Medien lag der Transkriptionsstartpunkt von *glnA1* 50 bp stromaufwärts des Startcodons „ATG“ (Abbildung 31, rote Sequenz, +1 unterstrichen). Die Gene CMM_RNA_0001a und CMM_RNA_0002a, welche für die 16S rRNA kodieren, beinhalten am 3‘-Ende die Sequenz 5‘-ATC**ACCTCCT**TTCTAAGGA-3’. Das 3’-Ende der Sequenz für die 16S rRNA in *E. coli* besteht aus den Basen 5’-**ACCTCCT**TA-3’ und wird als Anti-Shine-Dalgarno-Sequenz bezeichnet (Shine & Dalgarno, 1974). Die fett markierten Basen der Sequenz in *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* sind identisch mit denen der Sequenz in *E. coli*, liegen jedoch etwas weiter stromaufwärts. Die komplementäre Idealsequenz, die 4-14 Nukleotide stromaufwärts des Startcodons lokalisiert ist, wäre somit “**AGGAGGT**”. 12 Basen stromaufwärts des Startcodons für *glnA1* liegt die Sequenz “TGGAGAC” (Abbildung 31, B, rot und fett markiert), wobei nur vier Nukleotide identisch zur Idealsequenz sind. Die putative -10/-35-Region (Abbildung 31, B, unterstrichen) wurde mit

Hilfe von *E. coli* Promotorsequenzen (-10: “TATAAT”, -35: “TTGAGA”, Harley & Reynolds, 1987) ermittelt. Außerdem wurden in der 5’-Region von *glnA1*, entsprechend der 5’-Regionen von *pat-1* (Dreier *et al.*, 1997) und *celA* (Jahr *et al.*, 2000), direkte Wiederholungssequenzen identifiziert (Abbildung 31, B, blau). Ein Vergleich der 50 Nukleotide stromaufwärts der Startcodons von *glnA1* in *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* und in *C. glutamicum* lieferte eine 32%ige Übereinstimmung der beiden Sequenzen (Abbildung 31, C). Spezifische, übereinstimmende Promotormotive konnten nicht identifiziert werden.

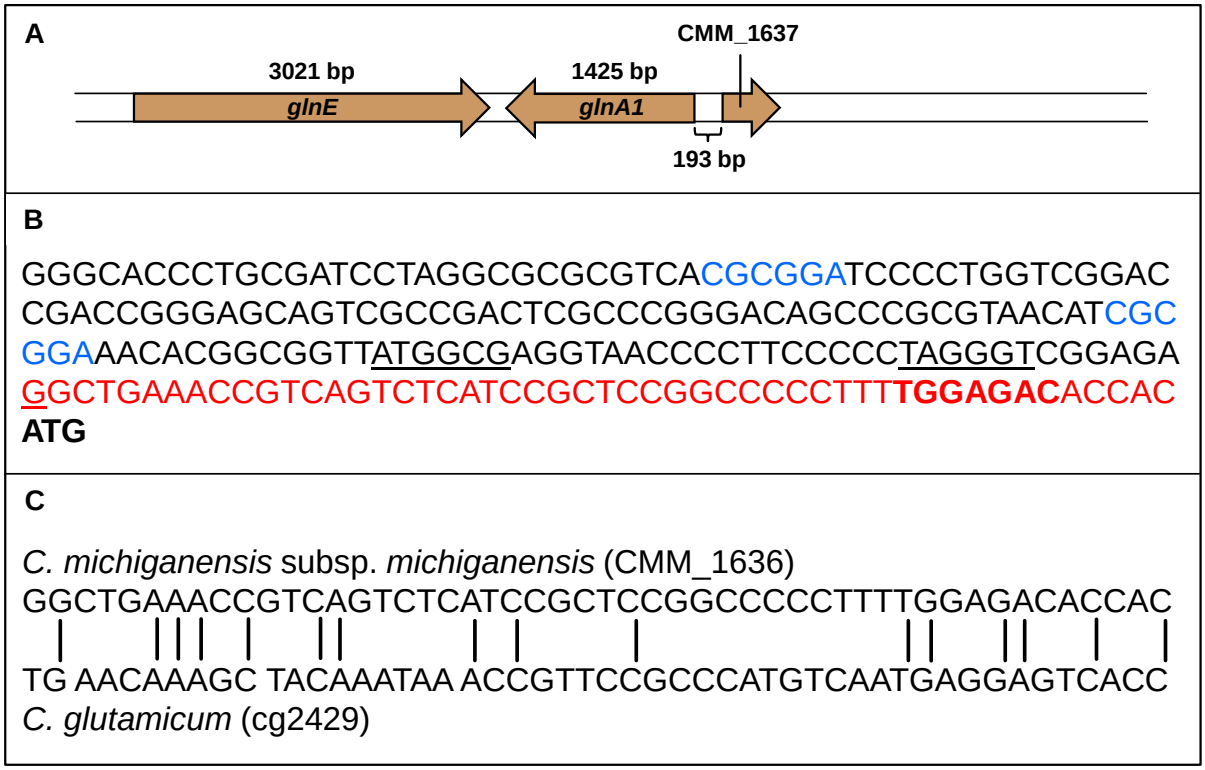


Abbildung 31: Analyse der *glnA1*-Promotorregion. A: Graphische Lokalisation des Gens CMM_1636 (*glnA1*) mit der 193 bp umfassenden 5‘-Region. **B:** Identifizierung des Transkriptionsstartpunktes mittels 5‘-*RACE*, 50 bp stromaufwärts des Startcodons ATG (rot unterstrichen). Sich wiederholende Sequenzen (blau), die putativen -10- und -35-Regionen (unterstrichen) sowie die mögliche Ribosomenbindestelle (rot, fett) sind hervorgehoben. **C:** Ein Vergleich der 5‘-Region des *glnA1*-Gens von *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* und *C. glutamicum* lieferte nur wenige Übereinstimmungen (senkrechte Striche).

4.6.2 Promotoranalyse des 5’-Transkriptoms mittels RNA-Sequenzierung

Die Analyse weiterer Promotoren wurde mittels RNA-Sequenzierung durchgeführt. Die Gesamt-RNA wurde dabei aus *Cmm*382-Kulturen, welche in TBY- und M9-Medium kultiviert wurden, isoliert. Je 10 µg RNA wurden eingesetzt, um die Proben für die Sequenzierung der cDNA-Bibliotheken vorzubereiten. Die Analyse der durch die Sequenzierung identifizierten 5‘-Transkripte erfolgte mit Hilfe des Computerprogrammes VAMP 1.7.5 unter der Anleitung von Dr. Jörn Kalinowski und Armin Neshat (CeBiTec, Universität Bielefeld). Weitere Analysen

wurden mit Hilfe der Programme *Weblogo* (http://weblogo.berkeley.edu) und *Improbizer* (http://users.soe.ucsc.edu/~kent/improbizer/improbizer.html) durchgeführt. Sequenzierte cDNA-Fragmente der gleichen Sequenz wurden dabei in VAMP 1.7.5 als grün-markierte *reads* dargestellt (Abbildung 32). Eine Anhäufung dieser cDNA-Fragmente lässt auf eine hohe mRNA-Konzentration schließen. Eine sprunghafte Erhöhung der 5'-Transkript-Konzentration, die in der Nähe eines Gens stattfindet, deutet auf einen Transkriptions-startpunkt hin.

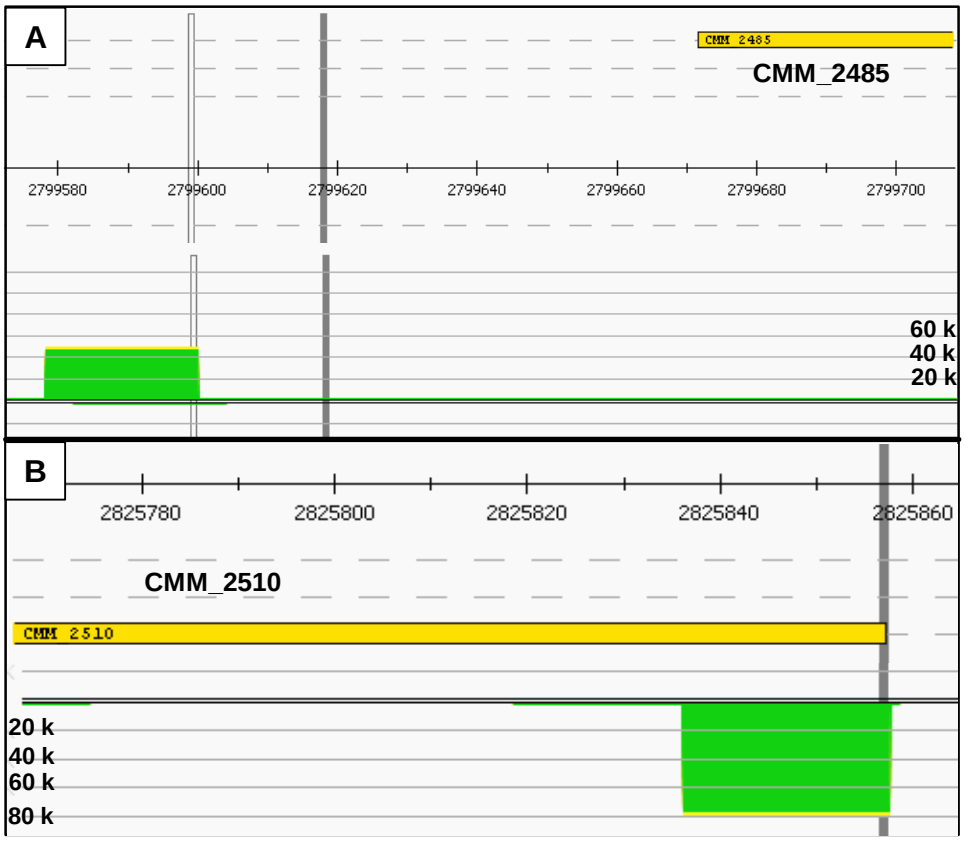


Abbildung 32: Analyse von Transkriptionsstartpunkten mittels VAMP 1.7.5. Eine hohe Konzentration von cDNA-Fragmenten und somit der entsprechenden 5'-Transkripte wurde als Anhäufung von *reads* (grün) dargestellt (untere Hälfte des Fensters). Ein sprunghafter Anstieg der *reads* deutet auf einen Transkriptionsstartpunkt hin. **A:** Transkriptionsstartpunkt auf dem „+"-Strang der DNA, etwa 90 Basen stromaufwärts des Startcodons von CMM_2485. **B:** Transkriptionsstartpunkt auf dem „-"-Strang der DNA, identisch mit dem Startcodon von CMM_2510. Es handelt sich um ein *leaderless*-Transkript ohne Ribosomen-Bindestelle. k: 1.000 *reads*

Etwa 90 Nukleotide stromaufwärts von CMM_2485 war eine Erhöhung der *read*-Zahl auf 50.000 zu erkennen (Abbildung 32, A und Tabelle 17), was auf einen Transkriptionsstartpunkt hinweist. Mit dem Erreichen des Startcodons von CMM_2510 stieg die *read*-Zahl auf 80.000-87.000 an (Abbildung 32, B und Tabelle 17). CMM_2510 liegt auf dem „-"-Strang der DNA, was in VAMP 1.7.5 durch eine Darstellung unterhalb der Lokalisationsachse zu erkennen ist. Da eine hohe Anzahl an 5'-Transkripten mit dem Startcodon von CMM_2510 zusammen

fielen, handelt es sich hierbei um ein *leaderless*-Transkript, dessen Sequenz keine Ribosomen-Bindestelle enthält. Die Startpunkte für die Transkription und Translation sind identisch.

Tabelle 17: Höchste identifizierte *read*-Zahlen der 5'-Transkripte von *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* mittels VAMP 1.7.5. M: M9-Medium, T: TBY-Medium, Nt: Nukleotide, „+": stromaufwärts, „-": stromabwärts, „=": im Gen.

***read*-Zahl**	**Abstand zum nächsten Gen**	**Gen**	**Funktion**
104.600 (T)	150 Nt (+)	CMM_2270 (*rplY*)	*50S ribosomal protein L25*
87.000 (T), 80.000 (M)	*leaderless*	CMM_2510 (*sigK*)	*RNA polymerase sigma factor, ECF subfamily*
62.000 (T)	150 Nt (+)	CMM_2580 (*rplM*)	*50S ribosomal protein L13*
50.000 (T)	80 Nt (+)	CMM_2485	*sugar ABC transporter, ATPase*
47.000 (T)	105 Nt (+)	CMM_1551 (*rpsT*)	*30S ribosomal protein S20*
47.000 (T)	*leaderless*	CMM_0010 (*ppiA*)	*peptidyl-prolyl cis-trans isomerase*
29.000 (T), 21.000 (M)	90 Nt (+)	CMM_2644	*ATP-dependent helicase*
20.500 (M)	22 Nt (+)	CMM_2761	*hypothetical protein*
20.000 (M)	55 Nt (+)	CMM_1625	*conserved membrane protein*
20.000 (T)	~ 400 Nt (+)	CMM_1550 (*holA*)	*DNA polymerase III, δ subunit*
18.000 (T)	120 Nt (+)	CMM_1611 (*cspA1*)	*cold shock protein*
17.600 (T)	30 Nt (+)	CMM_2151 (*nusA*)	*transcriptional termination/antitermination factor*
15.400 (T)	48 Nt (+)	CMM_2244 (*greA*)	*transcription elongation factor*
11.7000 (T)	122 Nt (+)	CMM_2934 (*hupB*)	*DNA-binding protein*
13.000 (T)	100 Nt (+)	CMM_1752 (*rpsA*)	*30S ribosomal protein S1*
10.000 (T)	27 Nt (+)	CMM_1617 (*acpP*)	*acyl carrier protein*
9.600 (T)	73 Nt (+)	CMM_1670	*oxidoreductase*
5.091 (T)	44 Nt (+)	pCM2_0036	*transcriptional regulator*
4.300 (M)	8 Nt (+)	CMM_1184	*hypothetical protein*
4.200 (M)	26 Nt (+)	CMM_2776	*hypothetical protein*
2.300 (M)	*leaderless*	CMM_0688	*hypothetical protein*
773 (T)	9 Nt nach „ATG" (=)	pCM2_0012	*hypothetical protein*
580 (T)	44 Nt vor „TAG" (=)	pCM2_0060	*hypothetical protein*
222 (M+T)	100 Nt (-)	pCM1_0028 (*repA*)	*putative replication protein*
207 (T)	27 Nt (+)	pCM2_0042	*hypothetical protein*
178 (M+T)	56 Nt (+)	pCM1_0009	*hypothetical protein*
123 (M+T)	45 Nt (+)	pCM1_0023 (*ppaJ*)	*extracellular serine protease*

Insgesamt wurden in TBY-Medium 12.634.480 *reads* identifiziert und in M9-Medium 15.479.792 *reads* (C. Rückert, CeBiTec, Universität Bielefeld, mündliche Mitteilung 2013). Die mittels VAMP 1.7.5 identifizierten 5‘-Transkripte mit der höchsten *read*-Zahl in pCM1, pCM2 und auf dem Chromosom sowie deren Abstand zum nächstgelegenen Gen sind in Tabelle 17 aufgelistet. In pCM1 war das *read*-Muster der RNA aus einer *Cmm*382-Kultur in M9- und TBY-Medium vergleichbar. In pCM1 und auf dem Chromosom war dieses Muster an einigen Stellen medienbedingt verschieden (Daten nicht gezeigt). Die *read*-Zahlen der 5‘-Transkripte des Chromosoms waren deutlich höher als die von pCM1 und pCM2 (Tabelle 17). Die höchste 5‘-Transkript-Konzentration wurde 150 Nukleotide stromaufwärts von CMM_2270 identifiziert. CMM_2270 kodiert für das ribosomale Protein L25 der 50S-Untereinheit. Hohe *read*-Zahlen waren ebenfalls 100-150 Nukleotide stromaufwärts von drei weiteren Genen zu erkennen, die für ribosomale Proteine kodieren. Eine hohe 5‘-Transkript-Konzentration wurde außerdem stromaufwärts von Genen identifiziert, die für Proteine der Replikations- und Transkriptionsmaschinerie kodieren sowie für Gene deren Funktion nicht bekannt ist. Der Abstand von Sequenzen mit hohen *read*-Zahlen zum nächstgelegenen Gen betrug zwischen acht und 400 Nukleotide. Daneben wurden drei *leaderless*-Transkripte identifiziert. Für die Gene pCM2_0012 und pCM2_0060 war eine hohe 5‘-Transkript-Konzentration stromabwärts des Startcodons sowie stromaufwärts des Stoppcodons zu erkennen. Bei einer hohen 5‘-Transkript-Konzentration nahe des putativen Startcodons im offenen Leserahmen eines Gens bei der Sequenz „ATG“ oder „GTG“ könnte es sich um ein weiteres oder das richtige Startcodon handeln. Das Transkript wäre demnach ein *leaderless*-Transkript. Eine hohe 5‘-Transkript-Konzentration im offenen Leserahmen eines Gens könnte auf einen zweiten Transkriptionsstart im Gen hinweisen. Wird eine hohe 5‘-Transkript-Konzentration festgestellt, ohne dass in der näheren Umgebung der Sequenz (≤ 150-200 Nukleotide) ein Gen lokalisiert ist, könnte es sich um ein nicht annotiertes Gen handeln (zum Beispiel für die 400 Nukleotide stromaufwärts von CMM_1550, Tabelle 17).

Neben den in Tabelle 17 aufgelisteten 27 Genen wurden weitere 58 Gene analysiert. Mit Hilfe einer manuellen Analyse wurden für 8,5 % der Gene im Genom von *Cmm*382 ein Anstieg der *read*-Zahlen mit dem Erreichen des Startcodons festgestellt und für 8,5 % der Gene ein Anstieg der *read*-Zahlen im offenen Leserahmen eines Gens (siehe Abschnitt 7.6, Tabelle 33 und Tabelle 34). Im Durchschnitt lagen die Transkriptionsstartpunkte der 85 analysierten Gene von pCM1, pCM2 und des Chromosoms zwischen 20 und 80 Nukleotide stromaufwärts des nachfolgenden Gens. Um mögliche konservierte Sequenzen in der 5‘-Region der Gene zu identifizieren, wurden jeweils 53 Nukleotide stromaufwärts der Gene analysiert, in deren Nähe in VAMP 1.7.5 eine hohe *read*-Zahl beobachtet wurde. Die Analyse erfolgte mit Hilfe des Programms *Improbizer,* lieferte jedoch keine konservierten Motive. Deshalb wurden,

soweit möglich, ausgehend von den *E. coli*-Sequenzen der Ribosomen-Bindestelle und der -10/-35-Region (Shine & Dalgarno, 1974; Harley & Reynolds, 1987) diese Motive in den Promotorregionen der 48 analysierten Gene (siehe Abschnitt 7.6 Tabelle 32) identifiziert und mit Hilfe des Programms “Weblogo” dargestellt (Abbildung 33).

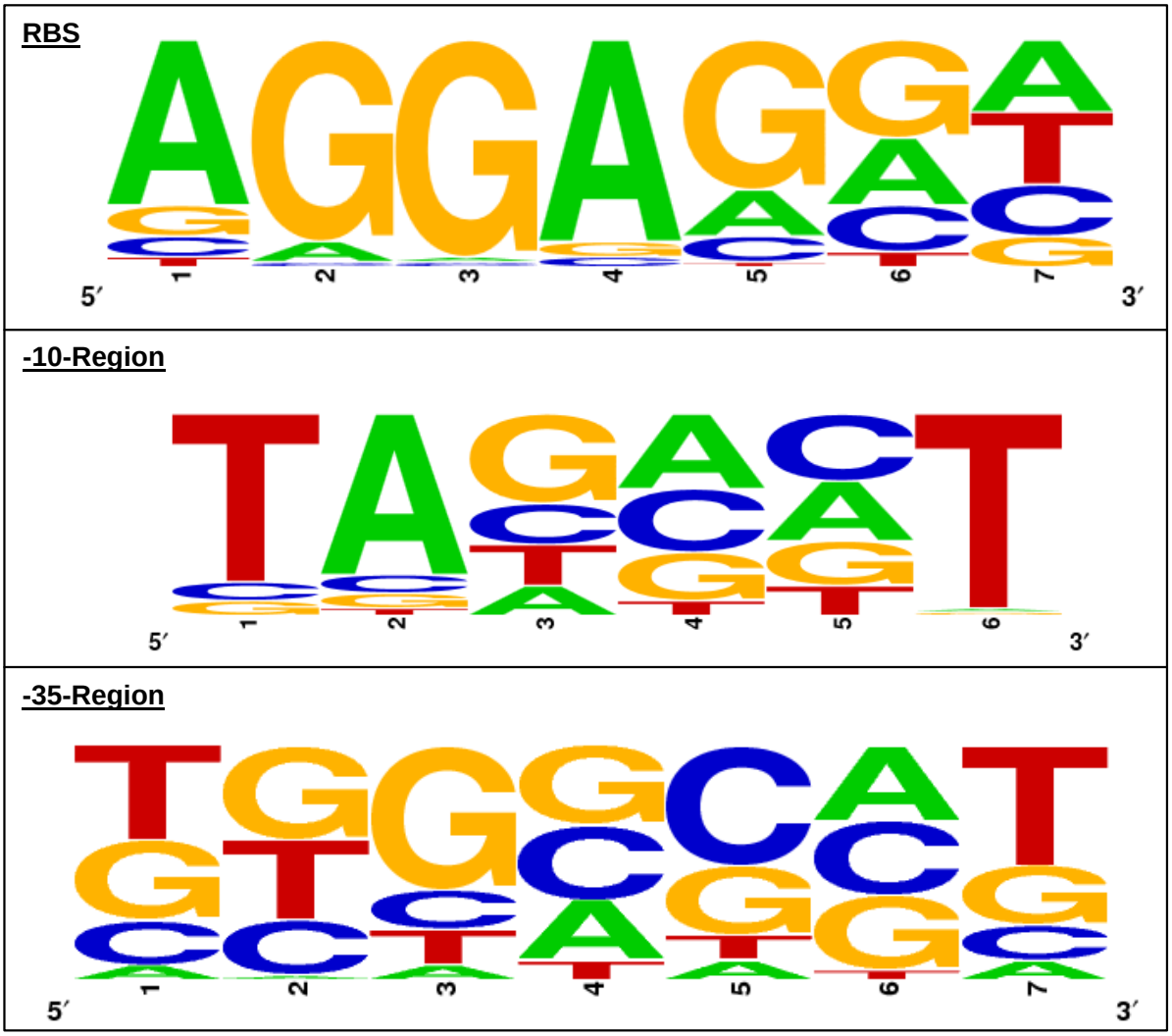


Abbildung 33: Mit Hilfe des Programms „Weblogo“ (http://weblogo.berkeley.edu) ermittelte grafische Häufigkeit der vier Nukleotide in der Sequenz der Ribosomenbindestelle (RBS) und der -10/-35-Region von 48 analysierten Genen. Die Idealsequenz der RBS ist „AGGAGGT” (Shine-Dalgarno-Sequenz: Shine & Dalgarno, 1974), da die Anti-Shine-Dalgarno-Sequenz am 3’-Ende der 16S rRNA-Sequenz von *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* “ACCTCCT” beträgt. Die *E. coli*-Sequenzen der -10/-35-Region sind “TATAAT” und “TTGAGA” (Harley & Reynolds, 1987).

Je größer ein Nukleotid dargestellt ist, desto häufiger kam es in den 48 Genregionen vor. Die Idealsequenz der Ribosomen-Bindestelle ist “AGGAGGT”, ausgehend von der Anti-Shine-Dalgarno-Sequenz der 16S rRNA von *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*. Die ersten vier Nukleotide der Idealsequenz waren in den 48 Genen zu etwa 70-95 % konserviert. An der 5. und 6. Position war die Base Guanin nur noch mit einer Wahrscheinlichkeit von etwa 30-60 %

vertreten. An der 6. Position waren alle vier Basen ungefähr gleich wahrscheinlich. In der -10-Region war das “T” an der sechsten Position zu fast 100 % konserviert, “T” und “A” an der ersten und zweiten Position waren zu 80-90 % konserviert. An den Positionen 3-5 kamen die vier Basen etwa gleich wahrscheinlich vor. Die -35-Region aus Abbildung 33 ist um ein Nukleotid länger als die -35-Region von *E. coli.* Die Base Thymin an Position 7 scheint jedoch in *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* mit etwa 50%iger Wahrscheinlichkeit dort vorzukommen, weshalb sie in Abbildung 33 mit aufgeführt wurde. Die Base Guanin an Position 3 scheint ebenfalls zu etwa 50 % konserviert zu sein. Die Wahrscheinlichkeit für die Base Adenin war an den Positionen 4 und 6 wesentlich höher als an den anderen Positionen. An Position 2 und 4-6 sind jeweils drei der vier Basen etwa gleich wahrscheinlich. Die Shine-Dalgarno-Sequenz in *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* ist somit an den ersten vier Positionen konserviert bis hochkonserviert. Die Basen an Position 1, 2 und 6 der -10-Region sind ebenfalls zu 80-100 % konserviert. Für die -35-Region konnte kein konserviertes Motiv ermittelt werden. Lediglich die 7. Position wurde in 50 % der Fälle mit der Base Thymin besetzt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das Motiv der -35-Region in *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* in den 48 analysierten Promotorregionen nicht konserviert war. Im Gegensatz dazu waren etwa 50 % der -10-Region und der Shine-Dalgarno-Sequenz konserviert.

5 Diskussion

Das Gram-positive Bakterium *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* löst in seiner Wirtspflanze *S. lycopersicum* (Tomate) Krankheitssymptome aus und richtet damit große landwirtschaftliche Schäden an. Ein besseres Verständnis über den Ablauf der Infektion und über bakterielle Virulenzfaktoren, die an der Wirt-Pathogen-Interaktion beteiligt sind, wäre von generellem Interesse und würde darüber hinaus helfen, die Ausbreitung des Bakteriums einzuschränken. In dieser Arbeit wurde deshalb eine molekularbiologische und biochemische Analyse des Bakteriums durchgeführt. Dabei wurde zum einen die Interaktion des Bakteriums mit Tomatenpflanzen und der Nicht-Wirts-Pflanze *Nicotiana* (Tabak) analysiert. Zum anderen wurde ein synthetisches Xylemsaft-imitierendes Medium etabliert. Darin wurde die Transkription und Translation von Virulenzfaktoren, die bei der Interaktion eine Rolle spielen könnten, analysiert. Zusätzlich wurde die zugrunde liegende Regulation näher betrachtet. Ein weiterer wichtiger Teil dieser Arbeit beschäftigte sich mit der Analyse von Promotorregionen, über die in *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* bis jetzt nur sehr wenig bekannt ist.

5.1 Interaktion von Nicht-Wirts- und Wirts-Pflanze mit *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*

5.1.1 Interaktion mit der Nicht-Wirts-Pflanze *Nicotiana*

Nicotiana-Arten (Tabak) und *M. jalapa* (Wunderblume) sind resistent gegenüber einer Infektion mit *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*. Nach der Infektion wird das bakterielle Wachstum durch einen lokalen Pflanzenzelltod (Nekrose) inhibiert, sodass die Ausbreitung der Bakterien in der Pflanze verhindert wird (Gitaitis, 1990; Alarcón *et al.*, 1998; Mysore & Ryu, 2004; Balaji *et al.*, 2011). Nekrotisches Gewebe wird dabei durch eine hypersensitive Antwort hervorgerufen, an der zum Beispiel auch die pflanzlichen Proteine Hsr201 und Hsr203J beteiligt sind (Gitaitis, 1990; Pontier *et al.*, 1994; Czernic *et al.*, 1996; Alarcón *et al.*, 1998).

In dieser Arbeit wurde untersucht, wann und wie stark nach der Infektion von Tabakblättern mit *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* nekrotisches Gewebe gebildet wurde und ob dadurch das bakterielle Wachstum eingeschränkt war (siehe Abschnitte 4.2.1 und 4.2.2). Außerdem wurden die Transkriptmengen von *hsr203J* in bakteriell- und $MgCl_2$-behandelten Blättern verglichen, um zu überprüfen, ob die Bildung von nekrotischem Gewebe auf eine hypersensitive Antwort zurückzuführen war (siehe Abschnitt 4.2.2). In allen Analysen wurde

dabei der Wildtypstamm *Cmm*382 mit dem plasmidfreien Stamm *Cmm*100 verglichen.
48 h nach der bakteriellen Infektion war in Tabakblättern eine Gelbfärbung des Gewebes (Chlorose) und vereinzelt auch schon eine lokale Nekrose zu erkennen, die sich bis zu acht Tage nach der Infektion ausbreitete und verstärkte. Die Transkriptmenge von *hsr203J* stieg 24 h nach der Infektion in *Cmm*100-inifizierten Blättern auf das 11-fache an, nach der Infektion mit *Cmm*382 war die Transkriptmenge 25-fach erhöht. 48 h nach der Infektion wurde jedoch wieder etwa das Ausgangsniveau zum Zeitpunkt der Infektion erreicht. Eine Einschränkung des bakteriellen Wachstums war über den beobachteten Zeitraum von 72 Stunden nach der Infektion nicht zu erkennen. Sowohl für den Wildtypstamm als auch für den plasmidfreien Stamm nahm die Bakteriendichte über diesen Zeitraum sogar leicht zu.

Aus den Ergebnissen in dieser Arbeit geht hervor, dass eindringende Bakterien von der Pflanze erkannt wurden und dadurch innerhalb von 24 Stunden eine hypersensitive Antwort hervorgerufen wurde. Eine Folge davon war ein lokaler Pflanzenzelltod, der etwa 48 Stunden nach der Infektion eintrat und sich daraufhin verstärkte und ausbreitete. Die dadurch zum Beispiel für *P. syringae* pv. *averrhoi* beobachtete Inhibierung des bakteriellen Wachstums (Wei *et al.*, 2012) war weder für den Wildtypstamm *Cmm*382 noch für den plasmidfreien Stamm *Cmm*100 zu erkennen. Im Gegensatz zur Infektion der Pflanze mit *P. syringae* pv. *averrhoi* wurde jedoch für die Infektion mit *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* ein 1.000-fach höheres Inokulum verwendet, da dieses für *C. michiganensis* nötig ist, um überhaupt die Bildung nekrotischen Gewebes hervorzurufen (Nissinen *et al.*, 2009; Baysal *et al.*, 2011). Aufgrund der hohen Bakteriendichte könnten die in der Pflanze nach der Erkennung hervorgerufenen Antwortreaktionen nicht ausreichen, um das bakterielle Wachstum vollständig zu inhibieren. Da *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* nachweislich längere Zeit auf Pflanzenablagerungen überleben kann (Fatmi & Schaad, 2002), wäre eine weitere Erklärung, dass die Bakterien in dem nekrotischen Gewebe weiter wachsen können. Antwortreaktionen, wie zum Beispiel eine Veränderung der Zellwand, in benachbarten und noch nicht infizierten Pflanzenzellen könnten jedoch die Ausbreitung der Bakterien verhindern. Dadurch würde es vermutlich erst zu einem späteren Zeitpunkt zu einer Wachstumsinhibierung durch ein begrenztes Nährstoffangebot kommen. *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* könnte außerdem in die hypersensitive Antwort der Pflanze eingreifen, sodass zwar nekrotisches Gewebe gebildet wird, andere Abwehrreaktionen, wie zum Beispiel die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies, aber eingeschränkt werden (Morel & Dangl, 1997). Eine weitere Erklärung wäre das auch schon in früheren Publikationen beobachtete inkonsistente Auftreten einer hypersensitiven Antwort in Tabakblättern nach der Infektion mit *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*, welche Temperatur-abhängig variierte (Gitaitis, 1990).

Die in dieser Arbeit beobachtete Zunahme des Wachstums von *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* sollte in weiterführenden Experimenten analysiert werden, wobei jedoch der Beobachtungszeitraum verlängert werden sollte. Des Weiteren könnte eine detailliertere Analyse der hypersensitiven Antwort durch die Bestimmung der Transkriptmengen weiterer Gene, wie beispielsweise *hsr515* und *hin1* (Czernic *et al.*, 1996; Pontier *et al.*, 1999), erfolgen.

5.1.2 Interaktion mit der Wirts-Pflanze *S. lycopersicum*

C. michiganensis subsp*. michiganensis* dringt über natürliche Öffnungen oder über Verwundungen in seine Wirtspflanze *S. lycopersicum* ein (Strider, 1969; Carlton *et al.*, 1998). Dabei findet die Infektion entweder schon im Keimlingsstadium über kontaminiertes Saatgut statt oder erst in einem späteren Wachstumsstadium der Tomatenpflanze. Wie die Bakterien dabei vom Infektionsort an ihren Besiedelungsort, die Xylemgefäße, gelangen und sich von dort ausbreiten, ist nur ansatzweise untersucht (Carlton *et al.*, 1998; Xu *et al.*, 2010). Nach der Infektion mit dem Wildtypstamm *Cmm*382 treten Krankheitssymptome wie Blattwelke, Stängelläsion und *birds eyes* auf den Tomatenfrüchten auf und die Pflanze stirbt in den meisten Fällen ab. Erfolgt die bakterielle Infektion in einem späten Wachstumsstadium der Pflanze, kann diese überleben. Die Samen entstehender Tomatenfrüchte können jedoch infiziert werden, sodass die Infektion auf die nächste Generation übergeht (Fatmi *et al.*, 1991).

In dieser Arbeit wurden Tomatensamen *in vitro* mit *C. michiganensis* subsp*. michiganensis* infiziert, um eine mögliche Besiedelung der keimenden Pflanze mit den Bakterien zu beobachten (siehe Abschnitt 4.3.3). Des Weiteren wurde eine Wurzelinfektion von Tomatenpflanzen in einem frühen Wachstumsstadium (zehn Tage) durchgeführt und es wurden sich entwickelnde Krankheitssymptome dokumentiert (siehe Abschnitt 4.3.1). Durch eine Infektion von Tomatenpflanzen in einem späten Wachstumsstadium (vier Wochen) wurde in dieser Arbeit außerdem analysiert, ob es dabei zu einer Infektion der Samen in sich bildenden Tomatenfrüchten kommen kann (siehe Abschnitt 4.3.2).
Fünf Wochen nach der Inkubation von Tomatensamen in einer Bakterien-Suspension waren *C. michiganensis* subsp*. michiganensis* in ruhenden Samen auf der Samenoberfläche lokalisiert. Im Gegensatz dazu konnten die Bakterien in keimenden Samen in absteigender Zahl in den Wurzeln, dem Hypocotyl und den Cotyledonen des Keimlings nachgewiesen werden. *Cmm*382-infizierte Keimlinge zeigten dabei typische Krankheitssymptome, bei *Cmm*100-infizierten Keimlingen war lediglich eine leichte Chlorose zu erkennen. Nach der Wurzelinfektion von Tomatenpflanzen in einem frühen Wachstumsstadium wurde in dieser

Arbeit oft eine uneinheitliche Bildung von Krankheitssymptomen beobachtet. Dabei traten diese zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Infektion auf, sie waren unterschiedlich stark ausgeprägt und traten in verschiedenen Kombinationen auf. Neben den typischen Symptomen wurde dabei auch ein verringertes Pflanzenwachstum beobachtet. Einige der infizierten Pflanzen zeigten auch noch nach vier Wochen keine Krankheitssymptome. Ein Eindringen von *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* in die Samen infizierter Tomatenpflanzen konnte in dieser Arbeit nicht gezeigt werden.

Eine Besiedelung des Keimlings nach der Inkubation von Tomatensamen in einer *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*-Suspension konnte auch schon von Xu und Kollegen gezeigt werden (Xu *et al.*, 2010). Die Lokalisation der Bakterien im Hypocotyl und den Cotyledonen konnte dabei ebenfalls beobachtet werden. Im Gegensatz zu Xu und Kollegen wurden jedoch in dieser Arbeit keine Bakterien mehr auf der Samenoberfläche keimender Samen nachgewiesen. Das könnte zum einen auf die Verwendung unterschiedlicher Bakterienstämme zurückgeführt werden, zum anderen auf die Unterschiede in der Durchführung der Infektion. Im Gegensatz zu Xu und Kollegen, die bei der fünfminütigen Inkubation der Samen in der Bakterienlösung (10^8 cfu/ml) ein Vakuum angelegt hatten, erfolgte die Inkubation in dieser Arbeit für 15 min bei einer Bakteriendichte von 8×10^9 cfu/ml ohne das Anlegen eines Vakuums. Eine Vakuum-basierende Sameninfektion erlaubt den Bakterien die Besiedelung von Hohlräumen im Samen, die zuvor mit Luft gefüllt waren und so das Eindringen unter die Samenhülle oder direkt in den Samen (Porter *et al.*, 1960; Puente & Bashan, 1993; Puente *et al.*, 2009). Dadurch werden jedoch keine natürlichen Bedingungen widergespiegelt, sodass die Besiedelung des Keimlings durch die Bakterien in der Natur vermutlich eher den Ergebnissen in dieser Arbeit entspricht.

Das in dieser Arbeit beobachtete uneinheitliche Auftreten von Krankheitssymptomen nach der frühen Infektion von Tomatenpflanzen mit *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* wurde bereits in einer früheren Publikation beschrieben (Chang *et al.*, 1992). Der von Chang und Kollegen erwähnte Einfluss der Temperatur, der Größe der zu infizierenden Tomatenpflanzen und des bakteriellen Inokulums auf die Ausbildung von Krankheitssymptomen könnte auch in dieser Arbeit als Erklärung für das unterschiedliche Auftreten von Blattwelke, Stängelläsion und verringertem Wachstum dienen.

Für das in dieser Arbeit beobachtete Ausbleiben jeglicher Krankheitssymptome könnten zwei Ursachen verantwortlich sein. Die Bakteriendichte in der Pflanze nach der Infektion war möglicherweise zu gering, um Krankheitssymptome auszulösen (Chang *et al.*, 1992). In einigen Bakterien werden beispielsweise erst Virulenzfaktoren exprimiert, wenn die Bakteriendichte hoch genug ist (Fuqua *et al.*, 1994; Chan *et al.*, 2004). Des Weiteren wäre eine Latenzzeit der Bakterien eine weitere mögliche Erklärung, bei der die Bakterien sich

zwar in der Pflanze ausbreiten, jedoch keine Krankheitssymptome auslösen (Tsiantos, 1987; Baysal *et al.*, 2011). Dabei ist eine Latenzzeit entweder abhängig von den oben genannten Faktoren, wie Temperatur, Pflanzengröße und bakterielles Inokulum, oder beispielsweise auf einen Verlust der natürlichen Plasmide von *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* zurückzuführen, die vermutlich zwischen den Bakterien ausgetauscht werden können (Chang *et al.*, 1992; Eichenlaub & Gartemann, 2011).
Die in dieser Arbeit gemachte Beobachtung, dass aus den Samen infizierter Pflanzen phänotypisch gesunde Pflanzen hervorgingen, könnte ebenfalls mit einer Latenzzeit der Bakterien erklärt werden. Des Weiteren könnte in dieser Arbeit keine Infektion der Tomatenfrüchte und damit der Samen stattgefunden haben. Die wahrscheinlichste Erklärung ist jedoch, dass die Samen zwar als Träger für die *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* dienten, die Bakterien jedoch nicht in den Keimling gelangen konnten. Findet bei der Keimung der Pflanze keine Verletzung statt, kann das Eindringen der Bakterien dadurch verhindert werden.

Zusammengefasst wird durch das nicht-einheitliche Auftreten oder das Ausbleiben von Krankheitssymptomen in *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*-infizierten Tomatenpflanzen die Analyse der Wirt-Pathogen-Interaktion erschwert und somit ebenfalls die Identifizierung von Virulenzfaktoren, die für die Pathogenität des Bakteriums verantwortlich sind (Büttner & Bonas, 2010). Eine Analyse von Virulenzfaktoren *in vivo* ist somit schwierig und wird außerdem durch technische Limitierungen eingegrenzt. Eine *in vitro*-Analyse erleichtert die Analyse von Virulenzfaktoren, es müssen jedoch experimentell Bedingungen vorliegen, bei denen eine Expression von Virulenzgenen möglich ist. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit das synthetische Medium XMM hergestellt, das die Bedingungen im Xylem imitiert (siehe Abschnitt 4.4.1).

5.2 Das synthetische Xylemsaft-imitierende Medium XMM

Für die Etablierung eines Xylemsaft-imitierenden Mediums für *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* wurde das *Xanthomonas*-Apoplasten-Medium XVM2 (Wengelnik *et al.*, 1996) als Basismedium verwendet. In XVM2-Medium konnte die Induktion von Virulenzfaktoren von *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* gezeigt werden (Wengelnik *et al.*, 1996). Es enthält die Zucker Fructose und Saccharose, die von *Xanthomonas* als Kohlenstoffquelle verwendet werden, und Ammonium, welches als Stickstoffquelle dient. Zusätzlich werden Aminosäuren zur Verfügung gestellt, die für die Expression von Virulenzgenen wichtig sind (Schulte & Bonas, 1992). Der natürliche Lebensraum von *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* in der Pflanze ist das nährstoffarme Xylem und nicht der Apoplast. Aus diesem Grund wurde das

Xanthomonas-Apoplasten-Medium an die Bedingungen im Xylem angeglichen. Dafür wurde in dieser Arbeit zunächst die Zusammensetzung des Xylemsaftes bestimmt. Der Xylemsaft wurde dabei aus vier Wochen alten Pflanzen isoliert und setzte sich wie folgt zusammen: 0 mM Saccharose, Fructose und Glucose, schwankende Aminosäuren-Konzentrationen im µM-Bereich, wobei Glutamin und Asparagin am stärksten vertreten waren, 33,3 mM Nitrat und 1,9 mM Ammonium. Eine in früheren Veröffentlichungen gemessene geringe Konzentration an Zuckern im Xylemsaft (Flügel *et al.*, 2012) war vermutlich auf eine Kontamination mit dem Phloemexudat zurückzuführen, die in dieser Arbeit durch eine fünfminütige Wartezeit vor der Entnahme des Xylemsaftes vermieden wurde.

Ausgehend von den gemessenen Komponenten des Xylemsaftes wurde das XVM2-Medium an die Bedingungen im Xylem angepasst. Anstelle der Zucker Fructose und Saccharose wurde eine erhöhte Konzentration an Aminosäuren verwendet, die dem Bakterium als Kohlenstoffquelle dienen. Statt Ammonium wurde Nitrat zur Verfügung gestellt, welches ausgehend von den Messungen in dieser Arbeit im Xylemsaft die vorherrschende Stickstoffquelle darstellte. Nitrat kann jedoch von *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* nicht verstoffwechselt werden, da keine Gene für eine Nitrat- und Nitrit-Reduktase im Genom des Bakteriums annotiert sind. Deshalb dienen vermutlich die Aminosäuren, vor allem Glutamin und Asparagin, als Stickstoffquelle, die auch in Pflanzen als Stickstoffspeicher genutzt werden (Tischner, 2000). Da jedoch auch eine hohe Nitrat-Konzentration im Xylemsaft und im XMM-Medium gemessen wurde, könnte Nitrat, obwohl es vom Bakterium nicht verwertet werden kann, trotzdem eine wichtige Komponente darstellen. Für *P. aeruginosa* konnte beispielsweise gezeigt werden, dass Nitrat als Signal für eine Änderung der Genexpression fungiert (Filiatrault *et al.*, 2005). Das angepasste Medium wurde *xylem mimicking medium* (XMM) bezeichnet und setzte sich wie folgt zusammen: 0 mM Saccharose, Fructose und Glucose und schwankende Aminosäuren-Konzentrationen im µM-Bereich, wobei die Konzentrationen insgesamt etwa zehn Mal höher waren als im Xylemsaft und Glutamat und Prolin am stärksten vertreten waren. Außerdem wurden 23,4 mM Nitrat und 1,6 mM Ammonium gemessen. Die Zusammensetzung des XMM-Mediums entspricht somit weitestgehend dem Xylemsaft.

Dass ein synthetisches Medium erfolgreich zur Analyse von Virulenzfaktoren verwendet werden kann, wurde schon mehrfach gezeigt (Arlat *et al.*, 1992; Huang *et al.*, 1992; Wei *et al.*, 1992; Wengelnik *et al.*, 1996). Auch für *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* wurden dazu schon Experimente durchgeführt und verschiedene *in vitro*-Bedingungen getestet (Flügel *et al.*, 2012; Savidor *et al.*, 2012). Ideale Bedingungen wurden dabei jedoch nicht erreicht. Mit dem in dieser Arbeit etablierten synthetischen Medium XMM wurden deshalb Analysen des Proteoms und Transkriptoms von *Cmm*382 durchgeführt, um das XMM-Medium als Xylemsaft-imitierendes Medium zu testen.

5.3 Das extrazelluläre Proteom von *Cmm*382 in M9- und XMM-Medium

Um die Expression von Virulenzfaktoren von *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* in XMM-Medium auf Proteomebene zu testen, wurde der Medienüberstand einer Bakterienkultur auf extrazelluläre Proteine hin analysiert. Die Genprodukte von 46 Genen im Genom von *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* sind als „extrazellulär“ annotiert (Flügel *et al.*, 2012). Für die Cellulase CelA und die Serinproteasen Pat-1, ChpC, ChpG, PpaA und PpaC wurde gezeigt, dass sie wichtig für die Ausbildung der Virulenz sind (Dreier *et al.*, 1997; Jahr *et al.*, 2000; Stork *et al.*, 2008; Eichenlaub & Gartemann, 2011). Neben Cellulasen und Serinproteasen sind weitere Gene im Genom von *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* vorhanden, deren Genprodukte eine Rolle bei der phytopathogenen Interaktion spielen könnten. Dazu zählen Pektatlyasen (PelA1 und PelA2), für die bekannt ist, dass sie für die Pathogenität von Bakterien wichtig sind (Ben-Daniel *et al.*, 2012), Xylanasen (XysA und XysB), Endoglucanasen (zum Beispiel CMM_0795), ein Expansin (ExpA) und Polygalacturonasen (PgaA).

In dieser Arbeit wurden die Proteine des Medienüberstands einer *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*-Kultur zum einen in drei Replikaten mittels MALDI-ToF Massenspektrometrie identifiziert und zum anderen auf ihre mögliche Cellulase-, Protease- und Pektinaseaktivität hin analysiert (siehe Abschnitt 4.4.2.2). Für die Identifizierung der Proteine wurde der Wildtypstamm *Cmm*382 in Minimalmedium und in dem Xylemsaft-imitierenden Medium XMM kultiviert. Für die Aktivitätsanalyse wurde zusätzlich der plasmidfreie Stamm *Cmm*100 verwendet, die Kultivierung erfolgte dabei lediglich in Minimalmedium.
Von den 46 annotierten extrazellulären Proteinen im Genom von *Cmm*382 wurden elf Proteine im M9-Medienübstand identifiziert und zehn Proteine im XMM-Mediumüberstand, wobei diese Proteine jeweils in allen drei Replikaten in das Medium sekretiert worden waren. Die Anzahl konnte auf je 23 bzw. 22 Proteine erhöht werden, wenn auch Proteine betrachtet wurden, die lediglich in einem oder zwei der Replikate identifiziert wurden. Dabei fiel auf, dass Proteine, die durch Gene auf den zwei natürlichen Plasmiden pCM1 und pCM2 exprimiert werden, in beiden Medien jeweils nur in einem der Replikate identifiziert wurden. Dies könnte entweder durch einen Plasmidverlust bei der Kultivierung der Bakterien erklärt werden oder dadurch, dass die Genprodukte plasmidkodierter Gene extrazellulär lediglich in einer sehr niedrigen Konzentration vorlagen. Die Analyse der Pektinaseaktivität war in dieser Arbeit nicht erfolgreich. Eine Cellulase- und Proteaseaktivität wurde in dieser Arbeit lediglich im Medienüberstand des Wildtypstammes *Cmm*382 und nicht in dem des plasmidfreien Stammes *Cmm*100 nachgewiesen, was darauf hinweist, dass die Aktivität durch plasmidkodierte Enzyme hervorgerufen wurde.

Die in dieser Arbeit beobachtete cellulolytische Aktivität im Medienüberstand einer *Cmm*382-Kultur kann vermutlich der Cellulase CelA zugeordnet werden. Neben *celA* ist nur noch ein weiteres Cellulasegen, *celB*, im Genom von *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* annotiert. CelB stellt jedoch ein Pseudogen dar, da ihm die für die Virulenz vermutlich essentielle C-terminale Domäne von CelA fehlt (Jahr *et al.*, 2000; Gartemann *et al.*, 2008). Ob CelA *in vivo* ebenfalls Cellulose in der pflanzlichen Zellwand angreift, konnte bis jetzt jedoch nicht gezeigt werden.

Die in dieser Arbeit beobachtete proteolytische Aktivität im Medienüberstand einer *Cmm*382-Kultur konnte bis jetzt in früheren Publikationen nicht nachgewiesen werden (Burger *et al.*, 2005; Eichenlaub & Gartemann, 2011). Diese kann aufgrund der fehlenden Aktivität im Medienüberstand einer *Cmm*100-Kultur auf eine oder mehrere der vier Serinprotease-Gene auf pCM1 und pCM2 zurückgeführt werden. Das Molekulargewicht der Genprodukte von pCM1_0023 (*ppaJ*), pCM2_0052 (*phpB*), pCM2_0053 (*phpA*) und pCM2_0054 (*pat-1*) liegt zwischen 30 und 34 kDa, was dem ermittelten Molekulargewicht in den Aktivitäts-Experimenten in etwa entspricht. Von diesen vier Serinproteasen wurden lediglich Pat-1 und PpaJ mittels Massenspektrometrie im Medienüberstand einer *Cmm*382-Kultur in Minimal-medium identifiziert, sodass die ermittelte Proteaseaktivität vermutlich durch Pat-1 und/oder PpaJ hervorgerufen wurde.

Eine Pektinaseaktivität konnte in dieser Arbeit nicht beobachtet werden. Pektin kann jedoch direkt nur von Pektin-Lyasen gespalten werden (Walter, 2002), für die im Genom von *Cmm*382 bis jetzt keine Gene annotiert wurden (http://cmr.jcvi.org). PelA1 und PelA2 sind die einzigen Pektat-Lyasen im Genom und können Pektin nur spalten, wenn es zuvor von Pektin-methylesterasen demethyliert wurde (Walter, 2002). Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass das Genom von *Cmm*382 somit vermutlich keine Gene für Pektin-Lyasen enthält. In weiterführenden Experimenten könnten deshalb bei der Bestimmung der Pektinaseaktivität Pektinmethylesterasen zugefügt werden, um eine Aktivität der Pektat-Lyasen zu erkennen.

Bei einem Vergleich der extrazellulären Proteine, die in dieser Arbeit in der M9- und der XMM-Kultur von *Cmm*382 identifiziert worden waren, war eine etwa 80%ige Übereinstimmung zu erkennen, darunter auch die Cellulase CelA und einige Serinproteasen, wie zum Beispiel Pat-1 (Tabelle 18). Von den identifizierten extrazellulären Proteinen einer *Cmm*382-Kultur in M9-Medium wurden die meisten sowohl in dieser Arbeit identifiziert als auch in Minimalmedium in der Arbeit von Tews (Tews, 2012, Tabelle 18). Es gab jedoch auch einige Unterschiede, für die es drei mögliche Erklärungen gibt. Proteine, die in dieser Arbeit in M9-Medium identifiziert wurden, bei Tews in Minimalmedium jedoch nicht auftauchen, zeigten in dieser Arbeit einen sehr geringen *Score*-Wert. In der Arbeit von Tews wurden jedoch lediglich Proteine aufgelistet und analysiert, deren *Score*-Werte höher als 47 waren. Proteine, die in

dieser Arbeit einen geringen *Score*-Wert zeigten, wurden deshalb in der Arbeit von Tews vermutlich nicht berücksichtigt. Differenzen zwischen beiden Arbeiten könnten außerdem mit Unterschieden bei der Kultivierung der Bakterien und der Vorbereitung der Proteine zur Analyse erklärt werden. Das Minimalmedium, dass in der Arbeit von Tews für die Kultivierung verwendet wurde, unterschied sich von dem in dieser Arbeit verwendeten M9-Medium vor allem durch eine vierfach erhöhte Glucosekonzentration und das Fehlen der Aminosäure Methionin, die von *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* für das Wachstum benötigt wird. Die extrazellulären Proteine wurden nach der Isolierung in der Arbeit von Tews mittels 2D-Gelelektrophorese nach ihrem isoelektrischen Punkt und ihrem Molekulargewicht aufgetrennt, die einzelnen *Spots* ausgeschnitten und mittels MALDI-ToF MS analysiert. Im Gegensatz dazu wurden die Proteine in dieser Arbeit in einer SDS-Gelelektrophorese für 5 min lediglich nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt, bevor sie aus dem Gel ausgeschnitten und mittels MALDI-ToF MS analysiert wurden. Nach einem Vergleich mit den Proteinen, die im Medienüberstand einer XMM-Kultur identifiziert wurden, scheint aber die in dieser Arbeit verwendete Methode besser geeignet zu sein, da etwas mehr Unterschiede zwischen dem extrazellulären Proteom in M9- und XMM-Medium beobachtet wurden (Tabelle 18). Diese Unterschiede könnten auf eine Rolle dieser extrazellulären Proteine bei der Wirt-Pathogen-Interaktion hindeuten.

Tabelle 18: Gene von *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*, deren Genprodukte in die Umgebung sekretiert werden. ✓: identifiziert, ✘ : nicht beschrieben.

Gen/Familie	**Diese Arbeit**		**(Tews, 2012) (Minimalmedium)**	**(Savidor *et al.*, 2012) (Xylemsaft infizierter Pflanzen)**
	M9-Medium	**XMM-Medium**		
celA	✓	✓	✓	✓
Serinproteasen-Gene				
pat-1	✓	✓	✓	✓
ppaJ	✓	✓	✓	✓
phpA	✘	✓	✓	✓
phpB	✘	✓	✓	✓
ppaA	✘	✘	✘	✓
ppaB1/2	✓	✓	✓	✓
ppaC	✓	✓	✓	✓
ppaD	✘	✘	✘	✓
ppaE-G	✓	✓	✓	✓
ppaH	✘	✓	✓	✓
ppaI	✓	✓	✓	✓
chpC	✘	✘	✓	✓

Gen/Familie	Diese Arbeit M9-Medium	Diese Arbeit XMM-Medium	(Tews, 2012) (Minimalmedium)	(Savidor *et al.*, 2012) (Xylemsaft infizierter Pflanzen)
chpE	✓	✓	✓	✓
chpF+G	✘	✘	✘	✓
Gene für weitere extrazelluläre Enzyme				
sbtA	✓	✘	✘	✓
sbtB	✓	✓	✓	✘
sbtC	✓	✓	✓	✓
pelA1+2	✓	✓	✘	✓
expA	✓	✘	✓	✓
xysA	✓	✓	✓	✓
xysB	✘	✓	✘	✘
pgaA	✓	✘	✓	✓
CMM_0795	✓	✓	✓	
CMM_0840	✓	✓	✓	

Bei einem Vergleich der extrazellulären Proteine, die in dieser Arbeit im Medienüberstand einer XMM-Kultur bzw. von Savidor und Kollegen im Xylemsaft infizierter Pflanzen identifiziert wurden, gab es einige Unterschiede (Savidor *et al.*, 2012, Tabelle 18). Der Xylemsaft wurde acht Tage nach der Infektion aus Pflanzen isoliert, wobei die Bakteriendichte etwa 10^9 cfu/g betrug und keine oder lediglich leichte Krankheitssymptome an der Pflanze zu erkennen waren (Savidor *et al.*, 2012). Die Bakteriendichte in XMM-Medium war mit 4-5 x 10^8 cfu/ml etwa halb so groß. Die Ergebnisse lassen vermuten, dass die Bedingungen in XMM-Medium nicht völlig identisch mit den Bedingungen im Xylemsaft, acht Tage nach der Infektion waren. Das XMM-Medium könnte somit ein anderes, vermutlich früheres Stadium der Infektion repräsentieren, in dem andere und noch nicht so viele extrazelluläre Proteine eine Rolle spielen. Diese Vermutung wurde in den nachfolgenden Analysen des Transkriptoms untersucht.

5.4 Das Transkriptom von *Cmm*382 in unterschiedlichen Medien

Neben der Analyse des Proteoms wurde in dieser Arbeit auch eine Analyse des Transkriptoms von *Cmm*382 durchgeführt, um Unterschiede in der Transkriptmenge in verschiedenen Medien feststellen zu können (siehe Abschnitt 4.4.3). Dabei wurde die Genexpression von 3.107 Genen in XMM-Medium und M9-Medium verglichen. Von den 426 Genen, die in XMM-Medium eine veränderte Transkriptmenge zeigten, waren 31 % “potentiell relevant in der phytopathogenen Interaktion“ (COG-Gruppe IV; Flügel *et al.*, 2012). Zu dieser

Gruppe zählen beispielsweise Gene die für Transporter, Regulatoren und extrazelluläre Enzyme kodieren. In XMM-Medium waren vor allem die Transkriptmengen von Transportern höher als in M9-Medium, die von Regulatoren niedriger. Lediglich für vier der 46 Gene im Genom von *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*, die für extrazelluläre Proteine kodieren, wurden in dieser Arbeit veränderte Transkriptmengen ermittelt. Eine Erklärung hierfür wäre, dass schon Minimalmedium ausreicht, um die Expression von Virulenzgenen zu verändern, wie es auch schon von anderen Arbeitsgruppen beobachtet wurde (Innes *et al.*, 1993; Flügel *et al.*, 2012). Da jedoch in dieser Arbeit die Transkriptmengen von Virulenzgenen in M9-Medium nicht höher waren als in Vollmedium, trifft diese Beobachtung für *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* wahrscheinlich eher nicht zu.

Die Ergebnisse aus den Transkriptom-Analysen in dieser Arbeit deuten eher darauf hin, dass in XMM-Medium Bedingungen vorliegen, wie sie in einem frühen Stadium der Infektion im Xylemsaft vorkommen. In diesem frühen Stadium müssen sich die Bakterien auf die nährstoffarme Umgebung des Xylemsaftes einstellen, um ein Wachstum und die Ausbreitung in der Pflanze zu ermöglichen. Dies wird durch eine erhöhte Konzentration von Transportern gewährleistet, durch die Substanzen aus der Umgebung zur Verfügung stehen, deren Konzentration sehr gering ist (Hänßler & Burkovski, 2008). Die Transkriptmengen einiger Regulatoren waren in dieser Arbeit in XMM-Medium niedriger als in M9-Medium. Die Regulatoren könnten dabei als Repressoren oder Aktivatoren die Genexpression von Genen, die in einem frühen Stadium der Infektion wichtig sind, verändern. Eine verringerte Konzentration an Repressoren ermöglicht die erhöhte Expression von Genen, weniger verfügbare Aktivatoren führen zu einer erniedrigten Genexpression. Extrazelluläre Enzyme, die in die Wirt-Pathogen-Interaktion eingreifen, spielen, ausgehend von den Ergebnissen in dieser Arbeit, zu diesem Zeitpunkt der Infektion noch keine große Rolle. Bei der Expression von Virulenzgenen, die beispielsweise für extrazelluläre Enzyme kodieren, könnte die Bakteriendichte von Bedeutung sein. Die Transkriptomanalysen in dieser Arbeit wurden bei einer Bakteriendichte von 4 x 10^8 cfu/ml durchgeführt, was lediglich 40 % der maximal erreichten Bakteriendichte *in planta* entspricht (Meletzus *et al.*, 1993). Erst wenn die Bakteriendichte in der Pflanze hoch genug ist, könnte die Expression von Virulenzgenen angeschaltet oder erhöht werden, wie es auch schon für *R. solanacearum* beobachtet werden konnte (Abramovitch *et al.*, 2006; Hikichi *et al.*, 2007). Zu einem späteren Zeitpunkt der Infektion, wenn Nährstoffe aus den zerstörten Pflanzenzellen zur Verfügung stehen, werden Virulenzgene wie extrazelluläre Enzyme vermutlich größtenteils nicht mehr benötigt und ihre Transkriptmenge nimmt wieder ab (Flügel *et al.*, 2012).

Die Etablierung eines synthetischen Mediums, das den Xylemsaft zu jedem Zeitpunkt der Infektion imitiert ist nicht möglich, da die Zusammensetzung des Xylemsaftes von vielen

Faktoren abhängig ist und sich somit ständig verändert (Marschner, 1986). Im Zuge der basalen Abwehrreaktion werden nach der bakteriellen Infektion beispielsweise pflanzliche Proteine sekretiert, die als Signal für die Expression bakterieller Virulenzgene dienen (Buhtz *et al.*, 2004; Krasikov *et al.*, 2011; Jacobs *et al.*, 2012). Solche Proteine wären zum Beispiel das Lektin-ähnliche Protein XSP30, Snakin-2, das Extensin-ähnliche Protein ELP, Peroxidasen, Serinproteasen und Chitinasen (Buhtz *et al.*, 2004; Balaji *et al.*, 2008; Balaji & Smart, 2012). Das in dieser Arbeit etablierte Xylemsaft-imitierende Medium repräsentiert die Bedingungen im Xylem, wie sie in einem frühen Stadium der Infektion vorliegen. Durch die Zugabe spezifischer Substanzen zu diesem Medium könnte die Expression von Virulenzgenen hervorgerufen werden, die zu einem anderen Zeitpunkt der Infektion wichtig sind. Eine spezifische pflanzliche Substanz wäre dabei zum Beispiel die Wundsubstanz Acetosyringon (Turk *et al.*, 1991), die in dieser Arbeit eine veränderte Genexpression in *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* hervorgerufen hatte.

5.5 Proteom- und Transkriptomdaten - Ein Vergleich

Bei einem Vergleich der Daten der Proteom- und Transkriptomanalyse wurden in dieser Arbeit nur wenige Übereinstimmungen gefunden. Diese Beobachtung wurde jedoch auch schon von anderen Arbeitsgruppen gemacht (Nie *et al.*, 2006; Chang *et al.*, 2012). Nie und Kollegen erklärten diese Abweichungen zum einen mit experimentellen Fehlern, zum anderen mit der komplexen Regulation der Transkription und Translation (Nie *et al.*, 2006). Der Vergleich der Massenspektrometrie-Daten mit den Microarray-Daten wird zusätzlich erschwert durch die unterschiedlichen Analyse-Methoden. Bei einer Analyse des Transkriptoms mittels Microarray verursachen der hohe G+C-Gehalt von *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* und das *Quenching* des Fluoreszenzsignals technische Probleme (Ramdas *et al.*, 2001; Lewis *et al.*, 2010; C. Rückert, CeBiTec, Universität Bielefeld, mündliche Mitteilung, 2013). Des Weiteren stimmen zum Teil die in Microarray-Experimenten ermittelten Transkriptmengen nicht mit der Konzentration überein, wie sie *in vivo* vorliegt (C. Rückert, CeBiTec, Universität Bielefeld, mündliche Mitteilung, 2013). Eine Analyse des Proteoms mittels Massenspektrometrie ist sehr sensitiv, sodass sogar Proteine im Femtomol-Bereich detektiert werden können (Hou *et al.*, 2010). Außerdem gibt die Analyse des Proteoms, im Gegensatz zur Analyse des Transkriptoms mittels Microarray, nicht nur Auskunft über eine veränderte Expression sondern auch über eine konstitutive Expression.
Da die Regulation der Genexpression bei der Wirt-Pathogen-Interaktion ebenfalls eine Rolle spielt und diese für *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* weitestgehend unbekannt ist, wurden in dieser Arbeit Experimente zur Identifizierung putativer Regulatoren durchgeführt.

5.6 Putative Transkriptionsregulatoren von *pat-1* und *celA*

Regulatoren spielen eine große Rolle bei der Pathogenität von Bakterien, da sie die Expression von Virulenzgenen in einer Wirt-Pathogen-Interaktion verändern können (Bonas *et al.*, 2000; Haghjoo & Galán, 2007; Wei *et al.*, 2007). Mittels Proteomanalysen wurden auch für *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* einige Regulatoren identifiziert, die vermutlich in der Wirt-Pathogen-Interaktion involviert sind (Savidor *et al.*, 2012). Spezifische Regulatoren wurden bis jetzt jedoch nicht identifiziert (Flügel, 2010). Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit nach möglichen Regulatoren für die zwei am besten charakterisierten Virulenzgene *pat-1* und *celA* gesucht.

In dieser Arbeit wurden mit Hilfe von Bindungsexperimenten und nachfolgender MALDI-ToF Massenspektrometrie 92 Regulatoren identifiziert, welche an die Promotorregionen von *pat-1* oder/und *celA* gebunden hatten (siehe Abschnitt 4.5.1). Die drei Regulatorgene CMM_2408, CMM_2766 und pCM2_0056 wurden mittels Insertionsmutagenese mutiert und die entsprechenden *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*-Stämme wurden in Pflanzeninfektionsversuchen, in RNA-Hybridisierungsexperimenten und in Wachstumsexperimenten mit dem Wildtypstamm *Cmm*382 verglichen (siehe Abschnitt 4.5.2 und 4.5.2). Dabei wurde als Wachstumsmedium das Vollmedium TBY, das Minimalmedium M9 und das Xylemsaft-imitierenden Medium XMM verwendet.
Die beiden Regulator-Gene CMM_2408 und CMM_2766 wurden in dieser Arbeit erfolgreich mittels Insertionsmutagenese mutiert, die Mutation von pCM2_0056 war aufgrund einer 100%igen Sequenzhomologie zu CMM_0055 nicht durchführbar. Der Mutantenstamm EH2408 zeigte ein im Gegensatz zu *Cmm*382 leicht eingeschränktes Wachstum in Vollmedium (TBY) und in XMM-Medium. Der Mutantenstamm EH2766 zeigte ein im Gegensatz zu *Cmm*382 leicht eingeschränktes Wachstum in Vollmedium (TBY) und ein deutlich eingeschränktes Wachstum in XMM-Medium. Im Gegensatz zu *celA*, dessen Transkriptmenge in keinem der drei Medien erhöht war, wurde für *pat-1* eine deutlich erhöhte Transkriptmenge in M9-Medium und eine leicht erhöhte Transkriptmenge in XMM-Medium nachgewiesen. In Infektionsexperimenten von Tomatenpflanzen wurde für beide Mutantenstämme, verglichen mit dem Wildtypstamm zum Teil eine frühere Entstehung von Krankheitssymptomen beobachtet sowie das Absterben einer größeren Zahl infizierter Pflanzen. Da das Experiment jedoch nur einmal erfolgreich durchgeführt werden konnte, können keine Aussagen getroffen werden, ob die Mutation von CMM_2408 und CMM_2766 einen Einfluss auf die Virulenz des Bakteriums hatte.
Aus den Ergebnissen in dieser Arbeit geht hervor, dass die Genprodukte von CMM_2408 und CMM_2766 an der Regulation der Genexpression des Serinproteasegens *pat-1* als

Repressoren beteiligt sind. Die unterschiedlich starke *pat-1*-Expression in den drei Medien weist darauf hin, dass neben den Repressoren weitere regulatorische Elemente notwendig sind. Ein Regulator, der die Genexpression auf ein Signal hin aktiviert, wäre vorstellbar, ebenso wie die Regulation mit Hilfe eines Sigma-Faktors oder durch mRNA-Abbau. In weiteren Experimenten könnte getestet werden, welchen Einfluss eine CMM_2408/ CMM_2766-Doppelmutante auf die Transkriptmenge von *pat-1* hat. Außerdem könnte die Promotorregion von *pat-1* auf Repressor- und Aktivator-Bindestellen hin analysiert werden. Sechs der in dieser Arbeit identifizierten Regulatoren wurden auch schon in früheren Veröffentlichungen nachgewiesen (Savidor *et al.*, 2012). Die Analyse dieser sechs Regulatoren wäre ein weiterer denkbarer Schritt.

5.7 Homologe Sequenzen innerhalb des Genoms von *Cmm*382

Wie schon erwähnt wurde bei der Insertionsmutagenese des Regulatorgens pCM2_0056 eine zu pCM2_0056 100 % identische Sequenz auf dem Chromosom (CMM_0055) identifiziert (siehe Abschnitt 4.5.2). Zur Überprüfung weiterer homologer Sequenzen wurde die Sequenz des Chromosoms mit den Sequenzen von pCM1 und pCM2 verglichen. Etwa 0,5 % des Chromosoms, 27 % von pCM2 und 7 % von pCM1 wiesen dabei Sequenzhomologien auf, wobei homologe Bereiche eine 82-98 %ige Identität zueinander zeigten (Abbildung 34).

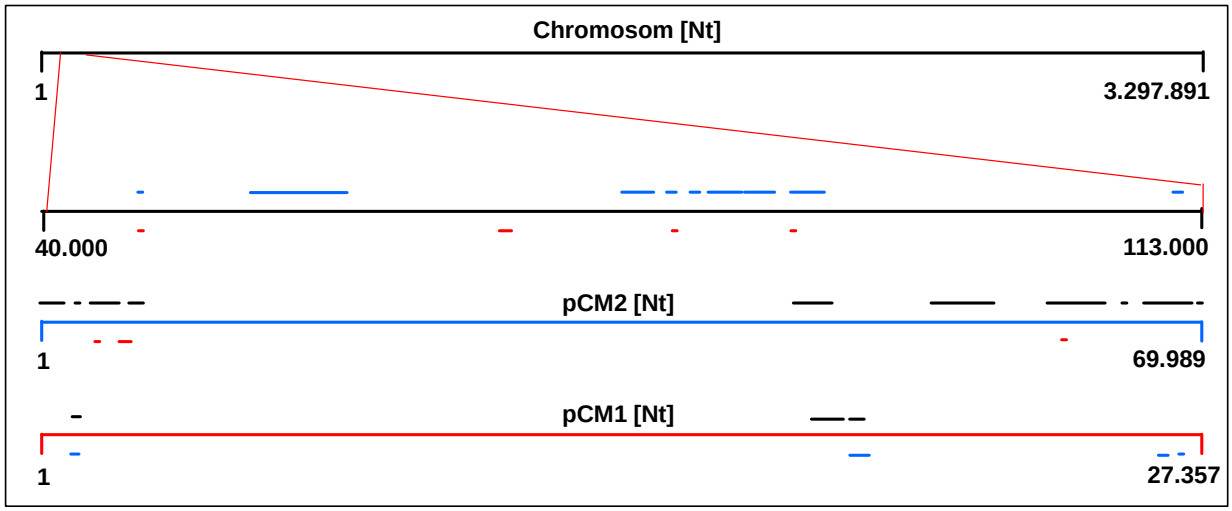


Abbildung 34: Sequenzvergleich des Chromosoms und der Plasmide pCM1 und pCM2. Ein Bereich über 73.000 Nukleotide im Chromosom (schwarz) zeigt in den homologen Sequenzen eine 88-92%ige Übereinstimmung mit der Sequenz von pCM2 (blau) oder pCM1 (rot). In beiden Plasmiden sind die homologen Sequenzen weiter gestreut. Etwa 0,5 % des Chromosoms, 27 % von pCM2 und 7 % von pCM1 weisen Sequenzhomologien auf. Nt: Nukleotide.

Dabei wurden wesentlich mehr Sequenzen auf dem Chromosom identifiziert, deren homologe Sequenzen auf pCM2 lokalisiert waren, als solche, die homologe Sequenzen zu denen auf pCM1 aufwiesen. Interessanterweise beschränkten sich die homologen Sequenzen im Chromosom auf einen Bereich von 73.000 Nukleotiden, was 2 % des gesamten Chromosoms entspricht. Dieser Bereich liegt genau in der *chp*-Region, die im Bereich der Nukleotide 38.100-117.150 lokalisiert ist, 44 Gene enthält und als mögliche Pathogenitätsinsel beschrieben wurde (Gartemann *et al.*, 2008). Homologe Bereiche könnten über eine Phageninfektion als fremde DNA in das bakterielle Genom integriert worden sein oder durch andere Mechanismen des horizontalen Gentransfers entstanden sein (Groisman & Ochman, 1996). Homologe Sequenzen könnten auch in zukünftigen Mutagenese-Studien Probleme bereiten.

5.8 Analyse der 5'-Transkripte mittels RNA-Sequenzierung

Um zukünftige Regulator-Bindestellen und somit Gene eines Regulons identifizieren zu können, deren Expression bei der Wirt-Pathogen-Interaktion gemeinsam reguliert wird, sind Promotoranalysen notwendig. Durch zur Verfügung stehende Konsensus-Sequenzen für Promotorstrukturen, wie die -10- und -35-Region sowie die Shine-Dalgarno-Sequenz, wird die Analyse noch nicht charakterisierter Promotoren vereinfacht. Promotorstudien wurden bis jetzt nur für die Virulenzgene *pat-1* (Dreier *et al.*, 1997) und *celA* (Jahr *et al.*, 2000) durchgeführt. Der Transkriptionsstartpunkt von *pat-1* liegt 97 Nukleotide stromaufwärts des Startcodons, der von *celA* 85 Nukleotide stromaufwärts. Die -10- und -35-Regionen bestehen für *pat-1* aus den Sequenzen "TATCAT" und "TTGGAG" und für *celA* aus den Sequenzen "TTTTGGG" und "GCCTCGGGG". Die -10/-35-Region zeigte bei *pat-1* Homologien zu den Sigma-Promotoren von *Bacillus* und *E. coli* (Dreier *et al.,* 1997; Jahr *et al.,* 2000).

Um mögliche Konsensus-Sequenzen in Promotorstrukturen der Gene im Genom von *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* zu identifizieren, wurde in dieser Arbeit zum einen die Promotorregion von *glnA1* analysiert, zum anderen wurde eine RNA-Sequenzierung des 5'-Transkriptoms durchgeführt, wobei als Wachstumsmedium Minimal- bzw. Vollmedium verwendet wurde. In M9-Medium wurden insgesamt 15.479.792 *reads* identifiziert und in TBY-Medium 12.634.480 *reads* (C. Rückert, CeBiTec, Universität Bielefeld, mündliche Mitteilung 2013). Die Gesamt-*Read*-Zahlen liegen damit im Bereich der für *Salmonella enterica* (7,9 Millionen *reads*), *Staphylococcus aureus* (9,1 Millionen *reads*), *Listeria monocytogenes* (14,5 Millionen *reads*) und *Enterococcus faecalis* (15,3 Millionen *reads*) identifizierten Zahlen (Lasa *et al.*, 2011). 48 Promotorregionen wurden anschließend analysiert. Die Shine-Dalgarno-Sequenz wurde dabei ausgehend von der putativen Anti-

Shine-Dalgarno-Sequenz am 3'-Ende der 16S rRNA ermittelt und entsprach mit "**AGGAGGT**" exakt der Ideal-Sequenz für *E. coli* (Shine & Dalgarno, 1974). Eine leicht bis stark abgewandelte Sequenz wurde in den meisten Promotorregionen 4-14 Nukleotide stromaufwärts des Startcodons identifiziert. Die -10- und -35-Regionen wurden in dieser Arbeit ebenfalls ausgehend von den Idealsequenzen für *E. coli* ermittelt (Shine & Dalgarno, 1974). Im Gegensatz zur -35-Region, die keine konservierten Nukleotide aufwies, konnten sowohl in der -10-Region als auch in der Shine-Dalgarno-Sequenz zu etwa 50 % konservierte Nukleotide ermittelt werden. Der Abstand des Transkriptionsstartpunktes zum Startcodon lag im Durchschnitt zwischen 20 und 80 Nukleotiden, zum Teil wurden jedoch auch 150 Nukleotide und mehr beobachtet. Bei einer umfangreicheren manuellen Analyse wurden für etwa 8,5 % der Gene im Genom von *C. michiganensis* subsp. *michiganensis leaderless*-Transkripte beobachtet, bei denen der Transkriptions- und der Translationspunkt identisch sind. Für weitere 8,5 % der Gene wurden hohe Transkriptmenge innerhalb der offenen Leserahmen identifiziert, obwohl in dieser Arbeit lediglich das 5'-Ende der mRNA sequenziert worden war.

Basierend auf den Ergebnissen in dieser Arbeit entspricht die Shine-Dalgarno-Sequenz "**aGGAgVn**", wobei "n" für alle Nukleotide steht, "V" für alle Nukleotide außer Thymin und große Buchstaben für höher konservierte Nukleotide. Die beiden konservierten Guanine, die in dieser Arbeit in 73 % der Promotorregionen identifiziert worden waren, wurden ebenfalls in den Promotorregionen von *pat-1* (Dreier *et al.*, 1997), *celA* (Jahr *et al.*, 2000) und *glnA1* nachgewiesen. Die Konsensussequenz der -10-Region entspricht nach der Analyse der 48 Promotorregionen der Sequenz "**TAnnnT**". Diese Sequenz stimmt mit der -10-Region von *pat-1* (Dreier *et al.*, 1997) und *glnA1* überein. Außerdem entspricht sie der für G+C-reiche Organismen ermittelten -10-Region "**TAnnnT**, die im Gegensatz zur typischen -10-Region von A+T-reichen Organismen, wie *E. coli*, nicht nur aus Adenin und Thymin bestehen muss (Zheng *et al.*, 2011).

Der in dieser Arbeit ermittelte Prozentsatz an *leaderless*-Transkripten liegt mit etwa 8,5 % weit unter dem für *Actinobacteria*-Genome errechneten Durchschnitt von 19,2 % (Zheng *et al.*, 2011). Die Anzahl der *leaderless*-Transkripte wurde in dieser Arbeit jedoch lediglich manuell bestimmt. Dadurch wurden vermutlich zum einen *leaderless*-Transkripte übersehen, zum anderen wurden für einige Gene mittels RNA-Sequenzierung keine Transkripte identifiziert. Diese Gene wurden vermutlich unter den gegebenen Bedingungen nicht exprimiert. Des Weiteren wurden bei der Analyse der *leaderless*-Transkripte die Gene nicht berücksichtigt, die einen Anstieg der Transkriptmenge im offenen Leserahmen zeigten. In *X. campestris* pv. *vesicatoria* wurde jedoch ebenfalls mit 14 % eine deutlich abweichende Zahl an *leaderless*-Transkripten identifiziert (Schmidtke *et al.*, 2012) als der für γ-

Proteobakterien berechnete Durchschnitt von 4,5 % (Zheng *et al.*, 2011). Eine Abweichung vom Durchschnitts-Wert könnte somit auch für *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* gelten.

Wird ein Anstieg der Transkriptmenge im offenen Leserahmen nahe des Startcodons identifiziert, könnte dies auf einen alternativen Transkriptionsstart hindeuten, wie es auch schon für einige Gene im Genom von *X. campestris* pv. *vesicatoria* festgestellt wurde (Schmidtke *et al.*, 2012). Eine Erklärung für die identifizierten Transkripte im gesamten offenen Leserahmen könnte eine unvollständige Fragmentierung der mRNA bei der Vorbereitung der Proben für die RNA-Sequenzierung sein, sodass noch sehr lange cDNA-Fragmente vorlagen, die weiter in den offenen Leserahmen reichten. Eine weitere Erklärung wäre das Auftreten von sogenannten *multireads* (Oshlack *et al.*, 2010; Van Verk *et al.*, 2013). *Multireads* sind sequenzierte cDNA-Fragmente, die zu mehr als einer Sequenz im Genom eines Organismus‘ homolog sind. Da, wie in dieser Arbeit gezeigt, das Genom von *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* einige homologe Bereiche aufweist, könnten diese *multireads* nicht nur das entsprechende 5‘-Ende der mRNA repräsentieren, sondern auch einen dazu homologen Bereich im offenen Leserahmen eines anderen Gens.

6 Literaturverzeichnis

Abramovitch, R. B., Anderson, J. C. and Martin, G. B. (2006). Bacterial elicitation and evasion of plant innate immunity. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **7(8):** 601-611.

Alarcón, C., Castro, J., Munoz, F., Arce-Johnson, P. and Delgado, J. (1998). Protein(s) from the Gram-positive bacterium *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* induces a hypersensitive response in plants. *Phytopathology.* **88(4):** 306-310.

Alfano, J. R. and Collmer, A. (1997). The type III (Hrp) secretion pathway of plant pathogenic bacteria: trafficking harpins, Avr proteins, and death. *J Bacteriol.* **179(18):** 5655-5662.

Amon, J., Bräu, T., Grimrath, A., Hänßler, E., Hasselt, K., Höller, M., Jeßberger, N., Ott, L., Szököl, J., Titgemeyer, F. and Burkovski, A. (2008). Nitrogen control in *Mycobacterium smegmatis*: nitrogen-dependent expression of ammonium transport and assimilation proteins depends on the OmpR-type regulator GlnR. *J Bacteriol.* **190(21):** 7108-7116.

Arlat, M., Gough, C. L., Zischek, C., Barberis, P. A., Trigalet, A. and Boucher, C. (1992). Transcriptional organization and expression of the large *hrp* gene cluster of *Pseudomonas solanacearum*. *Mol Plant Microbe Interact.* **5:** 187-193.

Baker, C. J., Mock, N. M., Whitaker, B. D., Roberts, D. P., Rice, C. P., Deahl, K. L. and Aver'yanov, A. A. (2005). Involvement of acetosyringone in plant-pathogen recognition. *Biochem Biophys Res Commun.* **328(1):** 130-136.

Balaji, V., Mayrose, M., Sherf, O., Jacob-Hirsch, J., Eichenlaub, R., Iraki, N., Manulis-Sasson, S., Rechavi, G., Barash, I. and Sessa, G. (2008). Tomato transcriptional changes in response to *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* reveal a role for ethylene in disease development. *Plant Physiol.* **146(4):** 1797-1809.

Balaji, V. and Sessa, G. (2008). Activation and manipulation of host responses by a Gram-positive bacterium. *Plant Signal Behav.* **3(10):** 839-841.

Balaji, V., Sessa, G. and Smart, C. D. (2011). Silencing of host basal defense response-related gene expression increases susceptibility of *Nicotiana benthamiana* to *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Phytopathology.* **101(3):** 349-357.

Balaji, V. and Smart, C. D. (2012). Over-expression of *snakin-2* and *extensin-like protein* genes restricts pathogen invasiveness and enhances tolerance to *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in transgenic tomato (*Solanum lycopersicum*). *Transgenic Res.* **21(1):** 23-37.

Baysal, Ö., Mercati, F., İkten, H., Yıldız, R. C., Carimi, F., Aysan, Y. and da Silva, J. A. T. (2011). *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*: Tracking strains using their genetic differentiations by ISSR markers in Southern Turkey. *Physiol Mol Plant Pathol.* **75:** 113-119.

Ben-Daniel, B. H., Bar-Zvi, D. and Tsror Lahkim, L. (2012). Pectate lyase affects pathogenicity in natural isolates of *Colletotrichum coccodes* and in *pelA* gene-disrupted and gene-overexpressing mutant lines. *Mol Plant Pathol.* **13(2):** 187-197.

Benjamini, Y. and Hochberg, Y. (1995). Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J R Statist Soc B.* **57(1):** 289-300.

Bentley, S. D., Corton, C., Brown, S. E., Barron, A., Clark, L., Doggett, J., Harris, B., Ormond, D., Quail, M. A., May, G., Francis, D., Knudson, D., Parkhill, J. and Ishimaru, C. A. (2008). Genome of the actinomycete plant pathogen *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* suggests recent niche adaptation. *J Bacteriol.* **190(6):** 2150-2160.

Bermphol, A., Dreier, J., Bahro, R. and Eichenlaub, R. (1996). Exopolysaccharides in the pathogenic interaction of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* with tomato plants. *Microbiol Res.* **151:** 391-399.

Boch, J. and Bonas, U. (2001). Gram-negative plant pathogenic bacteria. *Contrib Microbiol.* **8:** 186-196.

Bonas, U., Van den Ackerveken, G., Büttner, D., Hahn, K., Marois, E., Nennstiel, D., Noel, L., Rossier, O. and Szurek, B. (2000). How the bacterial plant pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* conquers the host. *Mol Plant Pathol.* **1(1):** 73-76.

Buhtz, A., Kolasa, A., Arlt, K., Walz, C. and Kehr, J. (2004). Xylem sap protein composition is conserved among different plant species. *Planta.* **219(4):** 610-618.

Burger, A., Gräfen, I., Engemann, J., Niermann, E., Pieper, M., Kirchner, O., Gartemann, K. H. and Eichenlaub, R. (2005). Identification of homologues to the pathogenicity factor Pat-1, a putative serine protease of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Microbiol Res.* **160(4):** 417-427.

Butte, A. J., Dzau, V. J. and Glueck, S. B. (2001). *Further defining housekeeping, or "maintenance," genes* Focus on "A compendium of gene expression in normal human tissues". *Physiol Genomics.* **7(2):** 95-96.

Büttner, D. and Bonas, U. (2010). Regulation and secretion of *Xanthomonas* virulence factors. *FEMS Microbiol Rev.* **34(2):** 107-133.

Carlson, R. R. and Vidaver, A. K. (1982). Taxonomy of *Corynebacterium* plant pathogens, including a new pathogen of wheat, based on polyacrylamide gel electrophoresis of cellular proteins. *Int J Syst Bacteriol.* **32(3):** 315-326.

Carlton, W. M., Braun, E. J. and Gleason, M. L. (1998). Ingress of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* into tomato leaves through hydathodes. *Phytopathology.* **88(6):** 525-529.

Chalupowicz, L., Cohen-Kandli, M., Dror, O., Eichenlaub, R., Gartemann, K. H., Sessa, G., Barash, I. and Manulis-Sasson, S. (2010). Sequential expression of bacterial virulence and plant defense genes during infection of tomato with *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Phytopathology.* **100(3):** 252-261.

Chalupowicz, L., Zellermann, E. M., Fluegel, M., Dror, O., Eichenlaub, R., Gartemann, K. H., Savidor, A., Sessa, G., Iraki, N., Barash, I. and Manulis-Sasson, S. (2012). Colonization and movement of GFP-labeled *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* during tomato infection. *Phytopathology.* **102(1):** 23-31.

Chan, W. C., Coyle, B. J. and Williams, P. (2004). Virulence regulation and quorum sensing in staphylococcal infections: competitive AgrC antagonists as quorum sensing inhibitors. *Journal of medicinal chemistry.* **47(19):** 4633-4641.

Chan, W. L., Yuo, C. Y., Yang, W. K., Hung, S. Y., Chang, Y. S., Chiu, C. C., Yeh, K. T., Huang, H. D. and Chang, J. G. (2013). Transcribed pseudogene *ψPPM1K* generates endogenous siRNA to suppress oncogenic cell growth in hepatocellular carcinoma. *Nucleic Acids Res.* **41(6):** 3734-3747.

Chang, J., Oikawa, S., Ichihara, G., Nanpei, Y., Hotta, Y., Yamada, Y., Tada-Oikawa, S., Iwahashi, H., Kitagawa, E., Takeuchi, I., Yuda, M. and Ichihara, S. (2012). Altered gene and protein expression in liver of the obese spontaneously hypertensive/NDmcr-cp rat. *Nutr Metab (Lond).* **9(1):** 87.

Chang, R. J., Ries, S. M. and Pataky, J. K. (1992). Effects of temperature, plant age, inoculum concentration, and cultivar on the incubation period and severity of bacterial canker of tomato. *Plant Dis.* **76(1):** 1150-1155.

Cohen, S. A. and Michaud, D. P. (1993). Synthesis of a fluorescent derivatizing reagent, 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate, and its application for the analysis of hydrolysate amino acids via high-performance liquid chromatography. *Anal Biochem.* **211(2):** 279-287.

Czernic, P., Huang, H. C. and Marco, Y. (1996). Characterization of *hsr201* and *hsr515*, two tobacco genes preferentially expressed during the hypersensitive reaction provoked by phytopathogenic bacteria. *Plant Mol Biol.* **31(2):** 255-265.

Davis, M. J., Gillaspie, A. G., Vidaver, A. K. and Harris, R. W. (1984). *Clavibacter*: a new genus containing some phytopathogenic coryneform bacteria, including *Clavibacter xyli* subsp *xyli* sp. nov., subsp. nov. and *Clavibacter xyli* subsp *cynodontis* subsp. nov., pathogens that cause ratoon stunting disease of sugarcane and Bermudagrass stunting disease. *Int J Syst Bacteriol.* **34(2):** 107-117.

de Jong, W., Wösten, H. A., Dijkhuizen, L. and Claessen, D. (2009). Attachment of *Streptomyces coelicolor* is mediated by amyloidal fimbriae that are anchored to the cell surface via cellulose. *Mol Microbiol.* **73(6):** 1128-1140.

de León, L., Siverio, F. and Rodríguez, A. (2006). Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in tomato seeds using immunomagnetic separation. *J Microbiol Meth.* **67(1):** 141-149.

Devillard, E., Goodheart, D. B., Karnati, S. K. R., Bayer, E. A., Lamed, R., Miron, J., Nelson, K. E. and Morrison, M. (2004). *Ruminococcus albus* 8 mutants defective in cellulose degradation are deficient in two processive endocellulases, Cel48A and Cel9B, both of which possess a novel modular architecture. *J Bacteriol.* **186(1):** 136-145.

Dixon, M. (1952). A nomogram for ammonium sulphate solutions. *Biochem J.* **54(3):** 457-458.

Dreier, J., Meletzus, D. and Eichenlaub, R. (1997). Characterization of the plasmid encoded virulence region *pat-1* of phytopathogenic *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Mol Plant Microbe Interact.* **10(2):** 195-206.

Eichenlaub, R. and Gartemann, K. H. (2011). The *Clavibacter michiganensis* subspecies: molecular investigation of gram-positive bacterial plant pathogens. *Annu Rev Phytopathol.* **49:** 445-464.

Eikmanns, B. J., Thum-Schmitz, N., Eggeling, L., Lüdtke, K. U. and Sahm, H. (1994). Nucleotide sequence, expression and transcriptional analysis of the *Corynebacterium glutamicum gltA* gene encoding citrate synthase. *Microbiology.* **140 (Pt 8):** 1817-1828.

Engemann, J. (2006). Charakterisierung des Peroxiredoxins Bcp von *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Dissertation, Universität Bielefeld.

Engström, P., Zambryski, P., Van Montagu, M. and Stachel, S. (1987). Characterization of *Agrobacterium tumefaciens* virulence proteins induced by the plant factor acetosyringone. *J Mol Biol.* **197(4):** 635-645.

Evtushenko, L. I., Dorofeeva, L. V., Subbotin, S. A., Cole, J. R. and Tiedje, J. M. (2000). *Leifsonia poae* gen. nov., sp. nov., isolated from nematode galls on *Poa annua*, and reclassification of '*Corynebacterium aquaticum*' Leifson 1962 as *Leifsonia aquatica* (ex Leifson 1962) gen. nov., nom. rev., comb. nov. and *Clavibacter xyli* Davis *et al.* 1984 with two subspecies as *Leifsonia xyli* (Davis *et al.* 1984) gen. nov., comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* **50(1):** 371-380.

Fatmi, M. and Schaad, N. W. (2002). Survival of *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis* in infected tomato stems under natural field conditions in California, Ohio and Morocc. *Plant Pathol.* **51:** 149-154.

Fatmi, M., Schaad, N. W. and Bolkan, H. A. (1991). Seed treatments for eradicating *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* from naturally infected tomato seeds. *Plant Dis.* **75:** 383-385.

Filiatrault, M. J., Wagner, V. E., Bushnell, D., Haidaris, C. G., Iglewski, B. H. and Passador, L. (2005). Effect of anaerobiosis and nitrate on gene expression in *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun.* **73(6):** 3764-3772.

Filippone, M. P., Diaz-Ricci, J. C., Castagnaro, A. P. and Farías, R. N. (2001). Effect of fragarin on the cytoplasmic membrane of the phytopathogen *Clavibacter michiganensis*. *Mol Plant Microbe Interact.* **14(7):** 925-928.

Flügel, M. (2010). Transkriptomanalysen zur Interaktion von *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* mit seiner Wirtspflanze. Dissertation, Universität Bielefeld.

Flügel, M., Becker, A., Gartemann, K. H. and Eichenlaub, R. (2012). Analysis of the interaction of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* with its host plant tomato by genome-wide expression profiling. *J Biotechnol.* **160(1-2):** 42-54.

Francis, I., Holsters, M. and Vereecke, D. (2010). The Gram-positive side of plant-microbe interactions. *Environ Microbiol.* **12(1):** 1-12.

Fuqua, W. C., Winans, S. C. and Greenberg, E. P. (1994). Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *J Bacteriol.* **176(2):** 269-275.

Gartemann, K. H., Abt, B., Bekel, T., Burger, A., Engemann, J., Flügel, M., Gaigalat, L., Goesmann, A., Gräfen, I., Kalinowski, J., Kaup, O., Kirchner, O., Krause, L., Linke, B., McHardy, A., Meyer, F., Pohle, S., Rückert, C., Schneiker, S., Zellermann, E. M., Pühler, A., Eichenlaub, R., Kaiser, O. and Bartels, D. (2008). The genome sequence of the tomato-pathogenic actinomycete *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* NCPPB382 reveals a large island involved in pathogenicity. *J Bacteriol.* **190(6):** 2138-2149.

Gartemann, K. H., Kirchner, O., Engemann, J., Gräfen, I., Eichenlaub, R. and Burger, A. (2003). *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*: first steps in the understanding of virulence of a Gram-positive phytopathogenic bacterium. *J Biotechnol.* **106(2-3):** 179-191.

Giannona, S. (2003). *β*-Alanin- und Pantothenattransport in Zusammenhang mit der Pantothenatproduktion in *Corynebacterium glutamicum*. Dissertation, Universität zu Köln.

Gitaitis, R. D. (1990). Induction of a hypersensitivelike reaction in four-o'clock by *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Plant Dis.* **74(1):** 58-60.

Gleason, M. L., Carlton, W. M. and Peterson, R. H. (1991). Survival and dissemination of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in tomatoes. *Phytopathology.* **81(12):** 1519-1523.

Gleason, M. L., Gitaitis, R. D. and Ricker, M. D. (1993). Recent progress in unterstanding and controlling bacterial canker of tomato in eastern North America. *Plant Dis.* 1069-1076.

Grant, S. G., Jessee, J., Bloom, F. R. and Hanahan, D. (1990). Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **87(12):** 4645-4649.

Groisman, E. A. and Ochman, H. (1996). Pathogenicity islands: bacterial evolution in quantum leaps. *Cell.* **87(5):** 791-794.

Gu, G., Cevallos-Cevallos, J. M. and van Bruggen, A. H. (2013). Ingress of *Salmonella enterica* Typhimurium into tomato leaves through hydathodes. *PLoS One.* **8(1):** e53470.

Guéneron, M., Timmers, A. C., Boucher, C. and Arlat, M. (2000). Two novel proteins, PopB, which has functional nuclear localization signals, and PopC, which has a large leucine-rich repeat domain, are secreted through the hrp-secretion apparatus of *Ralstonia solanacearum*. *Mol Microbiol.* **36(2):** 261-277.

Gunton, J. E., Gilmour, M. W., Alonso, G. and Taylor, D. E. (2005). Subcellular localization and functional domains of the coupling protein, TraG, from IncHI1 plasmid R27. *Microbiology.* **151(Pt 11):** 3549-3561.

Haghjoo, E. and Galán, J. E. (2007). Identification of a transcriptional regulator that controls intracellular gene expression in *Salmonella* Typhi. *Mol Microbiol.* **64(6):** 1549-1561.

Hansmeier, N., Chao, T. C., Kalinowski, J., Pühler, A. and Tauch, A. (2006b). Mapping and comprehensive analysis of the extracellular and cell surface proteome of the human pathogen *Corynebacterium diphtheriae*. *Proteomics.* **6(8):** 2465-2476.

Hansmeier, N., Chao, T. C., Pühler, A., Tauch, A. and Kalinowski, J. (2006a). The cytosolic, cell surface and extracellular proteomes of the biotechnologically important soil bacterium *Corynebacterium efficiens* YS-314 in comparison to those of *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032. *Proteomics.* **6(1):** 233-250.

Hänßler, E. and Burkovski, A. (2008). Molecular mechanisms of nitrogen control in Corynebacteria, pp. 183-201. *In A. Burkovski*, *Corynebacteria: Genomics and molecular biology*. Caister Academic Press, Wymondham, UK.

Harley, C. B. and Reynolds, R. P. (1987). Analysis of *E. coli* promoter sequences. *Nucleic Acids Res.* **15(5):** 2343-2361.

Hausbeck, M. K., Bell, J., Medina-Mora, C., Podolsky, R. and Fulbright, D. W. (2000). Effect of bactericides on population sizes and spread of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* on tomatoes in the greenhouse and on disease development and crop yield in the field. *Phytopathology.* **90(1):** 38-44.

Healy, F. G., Krasnoff, S. B., Wach, M., Gibson, D. M. and Loria, R. (2002). Involvement of a cytochrome P450 monooxygenase in thaxtomin A biosynthesis by *Streptomyces acidiscabies*. *J Bacteriol.* **184(7):** 2019-2029.

Henikoff, S., Haughn, G. W., Calvo, J. M. and Wallace, J. C. (1988). A large family of bacterial activator proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **85(18):** 6602-6606.

Hikichi, Y., Yoshimochi, T., Tsujimoto, S., Shinohara, R., Nakaho, K., Kanda, A., Kiba, A. and Ohnishi, K. (2007). Global regulation of pathogenicity mechanism of *Ralstonia solanacearum*. *Plant Biotechnol.* **24:** 149-154.

Hofmann, J., Börnke, F., Schmiedl, A., Kleine, T. and Sonnewald, U. (2011). Detecting functional groups of *Arabidopsis* mutants by metabolic profiling and evaluation of pleiotropic responses. *Front Plant Sci.* **2:** 82.

Hogenhout, S. A. and Loria, R. (2008). Virulence mechanisms of Gram-positive plant pathogenic bacteria. *Curr Opin Plant Biol.* **11(4):** 449-456.

Holtsmark, I., Mantzilas, D., Eijsink, V. G. H. and Brurberg, M. B. (2006). Purification, characterization, and gene sequence of Michiganin A, an actagardine-like lantibiotic produced by the tomato pathogen *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Appl Environ Microbiol.* **72(9):** 5814-5821.

Holtsmark, I., Takle, G. W. and Brurberg, M. B. (2008). Expression of putative virulence factors in the potato pathogen *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* during infection. *Arch Microbiol.* **189(2):** 131-139.

Hou, J., Xie, Z., Xue, P., Cui, Z., Chen, X., Li, J., Cai, T., Wu, P. and Yang, F. (2010). Enhanced MALDI-TOF MS analysis of phosphopeptides using an optimized DHAP/DAHC matrix. *J Biomed Biotechnol.* **2010:** 759690.

Hoving, S., Gerrits, B., Voshol, H., Müller, D., Roberts, R. C. and van Oostrum, J. (2002). Preparative two-dimensional gel electrophoresis at alkaline pH using narrow range immobilized pH gradients. *Proteomics.* **2(2):** 127-134.

Huang, H. C., He, S. Y., Bauer, D. W. and Collmer, A. (1992). The *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* 61 *hrpH* product, an envelope protein required for elicitation of the hypersensitive response in plants. *J Bacteriol.* **174:** 6878-6885.

Innes, R. W., Bent, A. F., Kunkel, B. N., Bisgrove, S. R. and Staskawicz, B. J. (1993). Molecular analysis of avirulence gene *avrRpt2* and identification of a putative regulatory sequence common to all known *Pseudomonas syringae* avirulence genes. *J Bacteriol.* **175(15):** 4859-4869.

Jacobs, J. M., Babujee, L., Meng, F., Milling, A. and Allen, C. (2012). The *in planta* transcriptome of *Ralstonia solanacearum*: conserved physiological and virulence strategies during bacterial wilt of tomato. *Am Soc Microbiol.* **3(4):** e00114-12.

Jahns, T., Zobel, A., Kleiner, D. and Kaltwasser, H. (1988). Evidence for carrier-mediated, energy-dependent uptake of urea in some bacteria. *Arch Microbiol.* **149(5):** 377-383.

Jahr, H., Bahro, R., Burger, A., Ahlemeyer, J. and Eichenlaub, R. (1999). Interactions between *Clavibacter michiganensis* and its host plants. *Environ Microbiol.* **1(2):** 113-118.

Jahr, H., Dreier, J., Meletzus, D., Bahro, R. and Eichenlaub, R. (2000). The endo-beta-1,4-glucanase CelA of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* is a pathogenicity determinant required for induction of bacterial wilt of tomato. *Mol Plant Microbe Interact.* **13(7):** 703-714.

Jones, J. D. and Dangl, J. L. (2006). The plant immune system. *Nature.* **444(7117):** 323-329.

Joshi, M., Rong, X., Moll, S., Kers, J., Franco, C. and Loria, R. (2007). *Streptomyces turgidiscabies* secretes a novel virulence protein, Nec1, which facilitates infection. *Mol Plant Microbe Interact.* **20(6):** 599-608.

Jung, M. Y., Park, I. S., Kim, W., Kim, H. L., Paek, W. K. and Chang, Y. H. (2010). *Clostridium arbusti* sp. nov., an anaerobic bacterium isolated from pear orchard soil. *Int J Syst Evol Microbiol.* **60(Pt 9):** 2231-2235.

Kabelka, E., Franchino, B. and Francis, D. M. (2002). Two loci from *Lycopersicon hirsutum* LA407 confer resistance to strains of *Clavibacter michiganensis* subsp *michiganensis*. *Phytopathology.* **92(5):** 504-510.

Karki, H. S., Barphagha, I. K. and Ham, J. H. (2012). A conserved two-component regulatory system, PidS/PidR, globally regulates pigmentation and virulence-related phenotypes of *Burkholderia glumae*. *Mol Plant Pathol.* **13(7):** 785-794.

Kaup, O., Gräfen, I., Zellermann, E. M., Eichenlaub, R. and Gartemann, K. H. (2005). Identification of a tomatinase in the tomato-pathogenic actinomycete *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* NCPPB382. *Mol Plant Microbe Interact.* **18(10):** 1090-1098.

Kers, J. A., Cameron, K. D., Joshi, M. V., Bukhalid, R. A., Morello, J. E., Wach, M. J., Gibson, D. M. and Loria, R. (2005). A large, mobile pathogenicity island confers plant pathogenicity on *Streptomyces* species. *Mol Microbiol.* **55(4):** 1025-1033.

Király, Z., El-Zahaby, H. M. and Klement, Z. (1997). Role of extracellular polysaccharide (EPS) slime of plant pathogenic bacteria in protecting cells to reactive oxygen species. *J Phytopathol.* **145:** 59-68.

Kirchner, O., Gartemann, K. H., Zellermann, E. M., Eichenlaub, R. and Burger, A. (2001). A highly efficient transposon mutagenesis system for the tomato pathogen *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Mol Plant Microbe Interact.* **14(11):** 1312-1318.

Knoppová, M., Phensaijai, M., Veselý, M., Zemanová, M., Nešvera, J. and Pátek, M. (2007). Plasmid vectors for testing *in vivo* promoter activities in *Corynebacterium glutamicum* and *Rhodococcus erythropolis*. *Curr Microbiol.* **55(3):** 234-239.

Köhler, B., Wegner, L. H., Osipov, V. and Raschke, K. (2002). Loading of nitrate into the xylem: apoplastic nitrate controls the voltage dependence of X-QUAC, the main anion conductance in xylem-parenchyma cells of barley roots. *Plant J.* **30(2):** 133-142.

Krasikov, V., Dekker, H. L., Rep, M. and Takken, F. L. (2011). The tomato xylem sap protein XSP10 is required for full susceptibility to *Fusarium* wilt disease. *J Exp Bot.* **62(3):** 963-973.

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* **227(5259):** 680-685.

Lasa, I., Toledo-Arana, A., Dobin, A., Villanueva, M., de los Mozos, I. R., Vergara-Irigaray, M., Segura, V., Fagegaltier, D., Penadés, J. R., Valle, J., Solano, C. and Gingeras, T. R. (2011). Genome-wide antisense transcription drives mRNA processing in bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **108(50):** 20172-20177.

Lee, I.-M., Bartoszyk, I. M., Gundersen-Rindal, D. E. and Davis, R. E. (1997). Phylogeny and classification of bacteria in the genera *Clavibacter* and *Rathayibacter* on the basis of 16S rRNA gene sequence analyses. *Appl Environ Microbiol.* **63(7):** 2631-2636.

Lewis, R. A., Laing, E., Allenby, N., Bucca, G., Brenner, V., Harrison, M., Kierzek, A. M. and Smith, C. P. (2010). Metabolic and evolutionary insights into the closely-related species *Streptomyces coelicolor* and *Streptomyces lividans* deduced from high-resolution comparative genomic hybridization. *BMC Genomics.* **11:** 682.

Lochner, A., Giannone, R. J., Keller, M., Antranikian, G., Graham, D. E. and Hettich, R. L. (2011). Label-free quantitative proteomics for the extremely thermophilic bacterium *Caldicellulosiruptor obsidiansis* reveal distinct abundance patterns upon growth on cellobiose, crystalline cellulose, and switchgrass. *J Proteome Res.* **10(12):** 5302-5314.

López-Millán, A. F., Morales, F., Abadía, A. and Abadía, J. (2000). Effects of iron deficiency on the composition of the leaf apoplastic fluid and xylem sap in sugar beet. Implications for iron and carbon transport. *Plant Physiol.* **124(2):** 873-884.

Loria, R., Bignell, D. R., Moll, S., Huguet-Tapia, J. C., Joshi, M. V., Johnson, E. G., Seipke, R. F. and Gibson, D. M. (2008). Thaxtomin biosynthesis: the path to plant pathogenicity in the genus *Streptomyces*. *Antonie Van Leeuwenhoek.* **94(1):** 3-10.

Madhaiyan, M., Poonguzhali, S., Kwon, S. W. and Sa, T. M. (2010). *Bacillus methylotrophicus* sp. nov., a methanol-utilizing, plant-growth-promoting bacterium isolated from rice rhizosphere soil. *Int J Syst Evol Microbiol.* **60(Pt 10):** 2490-2495.

Manzer, F. and Genereux, H. (1981). Ring root, pp. 31-32. *In W. J. Hocker*, *Compendium of potato diseases*. Am Phytopathol Soc, St. Paul, MN, USA.

Marschner, P. (1986). Mineral nutrients of higher plants, pp. 77-82. Academic Press, London.

McCulloch, L. (1925). *Aplanobacter insidiosum* n. sp., the cause of an alfalfa disease. *Phytopathol.* **15:** 496-497.

Meletzus, D., Bermpohl, A., Dreier, J. and Eichenlaub, R. (1993). Evidence for plasmid-encoded virulence factors in the phytopathogenic bacterium *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* NCPPB382. *J Bacteriol.* **175(7):** 2131-2136.

Meletzus, D. and Eichenlaub, R. (1991). Transformation of the phytopathogenic bacterium *Clavibacter michiganense* subsp. *michiganense* by electroporation and development of a cloning vector. *J Bacteriol.* **173(1):** 184-190.

Molino-Henares, A. J., Krell, T., Guazzaroni, M. E., Segura, A. and Ramos, J. L. (2006). Members of the IclR family o fbacterial transcriptional regulators function as activators and/or repressors. *FEMS Microbiol Rev.* **30:** 157-186.

Monteiro-Vitorello, C. B., Camargo, L. E. A., Van Sluys, M. A., Kitajima, J. P., Truffi, D., do Amaral, A. M., Harakava, R., de Oliveira, J. C. F., Wood, D., de Oliveira, M. C., Miyaki, C., Takita, M. A., da Silva, A. C. R., Furlan, L. R., Carraro, D. M., Camarotte, G., Almeida, N. F., Carrer, H., Coutinho, L. L., El-Dorry, H. A., Ferro, M. I. T., Gagliardi, P. R., Giglioti, E., Goldman, M. H. S., Goldman, G. H., Kimura, E. T., Ferro, E. S., Kuramae, E. E., Lemos, E. G. M., Lemos, M. V. F., Mauro, S. M. Z., Machado, M. A., Marino, C. L., Menck, C. F., Nunes, L. R., Oliveira, R. C., Pereira, G. G., Siqueira, W., de Souza, A. A., Tsai, S. M., Zanca, A. S., Simpson, A. J. G., Brumbley, S. M. and Setúbal, J. C. (2004). The genome sequence of the gram-positive sugarcane pathogen *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*. *Mol Plant Microbe Interact.* **17(8):** 827-836.

Morel, J. B. and Dangl, J. L. (1997). The hypersensitive response and the induction of cell death in plants. *Cell Death Differ.* **4(8):** 671-683.

Moreno-Paz, M. and Parro, V. (2006). Amplification of low quantity bacterial RNA for microarray studies: time-course analysis of *Leptospirillum ferrooxidans* under nitrogen-fixing conditions. *Environ Microbiol.* **8(6):** 1064-1073.

Morohashi, Y. (2002). Peroxidase activity develops in the micropylar endosperm of tomato seeds prior to radicle protrusion. *J Exp Bot.* **53(374):** 1643-1650.

Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. and Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *J Biotechnol.* **24:** 17-27.

Mundt, J. O. and Hinkle, N. F. (1976). Bacteria within ovules and seeds. *Appl Environ Microbiol.* **32(5):** 694-648.

Murashige, T. and Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plantarum.* **15:** 473-497.

Mysore, K. S. and Ryu, C. M. (2004). Nonhost resistance: how much do we know? *Trends Plant Sci.* **9(2):** 97-104.

Nie, L., Wu, G. and Zhang, W. (2006). Correlation of mRNA expression and protein abundance affected by multiple sequence features related to translational efficiency in *Desulfovibrio vulgaris*: a quantitative analysis. *Genetics.* **174(4):** 2229-2243.

Nissinen, R., Xia, Y. J., Mattinen, L., Ishimaru, C. A., Knudson, D. L., Knudson, S. E., Metzler, M. and Pirhonen, M. (2009). The putative secreted serine protease Chp-7 is required for full virulence and induction of a nonhost hypersensitive response by *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*. *Mol Plant Microbe Interact.* **22(7):** 809-819.

Nolden, L., Farwick, M., Krämer, R. and Burkovski, A. (2001). Glutamine synthetases of *Corynebacterium glutamicum*: transcriptional control and regulation of activity. *FEMS Microbiol Lett.* **201(1):** 91-98.

Oshlack, A., Robinson, M. D. and Young, M. D. (2010). From RNA-seq reads to differential expression results. *Genome Biol.* **11:** 220.

Parke, D., Ornston, L. N. and Nester, E. W. (1987). Chemotaxis to plant phenolic inducers of virulence genes is constitutively expressed in the absence of the Ti plasmid in *Agrobacterium tumefaciens*. *J Bacteriol.* **169(11):** 5336-5338.

Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* **29(9):** e45.

Pontier, D., Balagué, C. and Roby, D. (1998). The hypersensitive response. A programmed cell death associated with plant resistance. *C R Acad Sci III.* **321(9):** 721-734.

Pontier, D., Gan, S., Amasino, R. M., Roby, D. and Lam, E. (1999). Markers for hypersensitive response and senescence show distinct patterns of expression. *Plant Mol Biol.* **39(6):** 1243-1255.

Pontier, D., Godiard, L., Marco, Y. and Roby, D. (1994). *hsr*203J, a tobacco gene whose activation is rapid, highly localized and specific for incompatible plant/pathogen interactions. *Plant J.* **5(4):** 507-521.

Porter, F. E., McAlpine, V. W. and Kaerwer, H. E. (1960). Seed impregnation including bacterial and vacuum treatment. C. I. P. Office, Canada. Patent number: 608485.

Puente, M. E. and Bashan, Y. (1993). Effect of inoculation with *Azospirillum brasilense* strains on the germination and seedlings growth of the giant columnar cardon cactus (*Pachycereus pringlei*) *Symbiosis.* **15:** 49-60.

Puente, M. E., Li, C. Y. and Bashan, Y. (2009). Endophytic bacteria in cacti seeds can improve the development of cactus seedlings. *Plant Biology.* **6:** 643-650.

Quidde, T., Osbourn, A. E. and Tudzynski, P. (1998). Detoxification of *α*-tomatine by *Botrytis cinerea*. *Physiol Mol Plant Pathol.* **52:** 151-165.

Ramdas, L., Coombes, K. R., Baggerly, K., Abruzzo, L., Highsmith, W. E., Krogmann, T., Hamilton, S. R. and Zhang, W. (2001). Sources of nonlinearity in cDNA microarray expression measurements. *Genome Biol.* **2(11):** research0047.1-research0047.7.

Rehm, H. (2006). Der Experimentator. Proteinbiochemie/Proteomics, pp. 222-225. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.

Rellan-Alvarez, R., Lopez-Gomollon, S., Abadia, J. and Alvarez-Fernandez, A. (2011). Development of a new high-performance liquid chromatography-electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry method for the determination of low molecular mass organic acids in plant tissue extracts. *J Agr Food Chem.* **59(13):** 6864-6870.

Rho, H. S., Jeon, J. and Lee, Y. H. (2009). Phospholipase C-mediated calcium signalling is required for fungal development and pathogenicity in *Magnaporthe oryzae*. *Mol Plant Pathol.* **10(3):** 337-346.

Rietz, S. and Parker, J. E. (2007). Plant disease and defence, *Encyclopedia of Life Sciences*. John Wiley & Sons.

Romano, A. H. and Nickerson, W. J. (1958). Utilization of amino acids as carbon sources by *Streptomyces fradiae*. *J Bacteriol.* **75(2):** 161-166.

Ryan, R. P., Vorhölter, F. J., Potnis, N., Jones, J. B., Van Sluys, M. A., Bogdanove, A. J. and Dow, J. M. (2011). Pathogenomics of *Xanthomonas*: understanding bacterium-plant interactions. *Nat Rev Microbiol.* **9(5):** 344-355.

Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.

Savidor, A., Teper, D., Gartemann, K. H., Eichenlaub, R., Chalupowicz, L., Manulis-Sasson, S., Barash, I., Tews, H., Mayer, K., Giannone, R. J., Hettich, R. L. and Sessa, G. (2012). The *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*-tomato interactome reveals the perception of pathogen by the host and suggests mechanisms of infection. *J Proteom Res.* **11(2):** 736-750.

Schägger, H. and von Jagow, G. (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem.* **166:** 368-379.

Schjoerring, J. K., Husted, S., Mäck, G. and Mattsson, M. (2002). The regulation of ammonium translocation in plants. *J Exp Bot.* **53(370):** 883-890.

Schmidtke, C., Findeiß, S., Sharma, C. M., Kuhfuß, J., Hoffmann, S., Vogel, J., Stadler, P. F. and Bonas, U. (2012). Genome-wide transcriptome analysis of the plant pathogen *Xanthomonas* identifies sRNAs with putative virulence functions. *Nucleic Acids Res.* **40(5):** 2020-2031.

Schneider, T., Gerrits, B., Gassmann, R., Schmid, E., Gessner, M. O., Richter, A., Battin, T., Eberl, L. and Riedel, K. (2010). Proteome analysis of fungal and bacterial involvement in leaf litter decomposition. *Proteomics.* **10(9):** 1819-1830.

Schulte, R. and Bonas, U. (1992). A *Xanthomonas* pathogenicity locus is induced by sucrose and sulfur-containing amino acids. *The Plant cell.* **4(1):** 79-86.

Seoane, A. S. and Levy, S. B. (1995). Characterization of MarR, the repressor of the multiple antibiotic resistance (*mar*) operon in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* **177(12):** 3414-3419.

Setubal, J. C., Moreira, L. M. and da Silva, A. C. (2005). Bacterial phytopathogens and genome science. *Curr Opin Microbiol.* **8(5):** 595-600.

Shine, J. and Dalgarno, L. (1974). The 3'-terminal sequence of *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA: complementarity to nonsense triplets and ribosome binding sites. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **71(4):** 1342-1346.

Siewers, V., Smedsgaard, J. and Tudzynski, P. (2004). The P450 monooxygenase BcABA1 is essential for abscisic acid biosynthesis in *Botrytis cinerea*. *Appl Environ Microbiol.* **70(7):** 3868-3876.

Stitt, M., Lilley, R. M., Gerhardt, R. and Heldt, H. W. (1989). Metabolite levels in specific cells and subcellular compartments of plant-leaves. *Method Enzymol.* **174:** 518-552.

Stork, I., Gartemann, K. H., Burger, A. and Eichenlaub, R. (2008). A family of serine proteases of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*: *chpC* plays a role in colonization of the host plant tomato. *Mol Plant Pathol.* **9(5):** 599-608.

Strider, D. L. (1969). Bacterial canker of tomato caused by *Corynebacterium michiganense*. A literature review and bibliography, vol. 193. Agric Exp Sta Tech Bull, North Carolina.

Tabor, S. and Richardson, C. C. (1985). A bacteriophage T7 RNA polymerase/promoter system for controlled exclusive expression of specific genes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **82(4):** 1074-1078.

Tatusov, R. L., Galperin, M. Y., Natale, D. A. and Koonin, E. V. (2000). The COG database: a tool for genome-scale analysis of protein functions and evolution. *Nucleic Acids Res.* **28(1):** 33-36.

Tews, H. (2012). Das Exoproteom von *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* und Untersuchung von Mutanten im Sec- und Tat-Sekretionssystem. Dissertation, Universität Bielefeld.

Tischner, R. (2000). Nitrate uptake and reduction in higher and lower plants. *Plant Cell Environ.* **23:** 1005-1024.

Tiwari, A. K., Vishwakarma, S. K., Kumar, P., Pandey, N. and Lal, M. (2012). Ratoon stunting disease (*Leifsonia xyli*) of sugarcane. *Plant Knowledge Journal.* **1(1):** 20-24.

Tsiantos, J. (1987). Transmission of bacterium *Corynebacterium michiganense* pv. *michiganense* by seeds. *J Phytopathol.* **119:** 142-146.

Turk, S. C., Melchers, L. S., den Dulk-Ras, H., Regensburg-Tuïnk, A. J. and Hooykaas, P. J. (1991). Environmental conditions differentially affect *vir* gene induction in different *Agrobacterium* strains. Role of the VirA sensor protein. *Plant Mol Biol.* **16(6):** 1051-1059.

Turpin, W., Humblot, C., Noordine, M. L., Thomas, M. and Guyot, J. P. (2012). *Lactobacillaceae* and cell adhesion: genomic and functional screening. *PLoS One.* **7(5):** e38034.

Van Verk, M. C., Hickman, R., Pieterse, C. M. J. and Van Wees, S. C. M. (2013). RNA-Seq: revelation of the messengers. *Trends Plant Sci.* **18(4):** 175-179.

Vera, J., Castro, J., Gonzalez, A. and Moenne, A. (2011). Seaweed polysaccharides and derived oligosaccharides stimulate defense responses and protection against pathogens in plants. *Mar Drugs.* **9(12):** 2514-2525.

Vidaver, A. K. (1974). *Corynebacterium nebraskense*, a new, orange-pigmented phytopathogenic species. *Int J Syst Bacteriol.* **24:** 482-485.

Wallis, F. M. (1977). Ultrastructural histopathology of tomato plants infected with *Corynebacterium michiganense*. *Physiol Plant Pathol.* **11:** 333-342.

Walter, M. (2002). Die parallele *β*-Helix der Pektat-Lyase aus *Bacillus subtilis*: Stabilität, Faltungsmechanismus und Faltungsmutanten. Dissertation, Universität Potsdam.

Walton, J. D. (1994). Deconstructing the cell wall. *Plant Physiol.* **104(4):** 1113-1118.

Watt, S. A., Wilke, A., Patschkowski, T. and Niehaus, K. (2005). Comprehensive analysis of the extracellular proteins from *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* B100. *Proteomics.* **5(1):** 153-167.

Wei, C. F., Hsu, S. T., Deng, W. L., Wen, Y. D. and Huang, H. C. (2012). Plant innate immunity induced by flagellin suppresses the hypersensitive response in non-host plants elicited by *Pseudomonas syringae* pv. *averrhoi*. *PLoS One.* **7(7):** e41056.

Wei, K., Tang, D. J., He, Y. Q., Feng, J. X., Jiang, B. L., Lu, G. T., Chen, B. and Tang, J. L. (2007). *hpaR,* a putative *marR* family transcriptional regulator, is positively controlled by HrpG and HrpX and involved in the pathogenesis, hypersensitive response, and extracellular protease production of *Xanthomonas campestris* pathovar *campestris*. *J Bacteriol.* **189(5):** 2055-2062.

Wei, Z. M., Laby, R. J., Zumoff, C. H., Bauer, D. W., He, S. Y., Collmer, A. and Beer, S. V. (1992). Harpin, elicitor of the hypersensitive response produced by the plant pathogen *Erwinia amylovora*. *Science.* **257:** 85-88.

Wengelnik, K., Marie, C., Russel, M. and Bonas, U. (1996). Expression and localization of HrpA1, a protein of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* essential for pathogenicity and induction ofthe hypersensitive reaction. *J Bacteriol.* **178(4):** 1061-1069.

Windt, C. W., Gerkema, E. and Van As, H. (2009). Most water in the tomato truss is imported through the xylem, not the phloem: a nuclear magnetic resonance flow imaging study. *Plant Physiol.* **151(2):** 830-842.

Xu, X. L., Miller, S. A., Baysal-Gurel, F., Gartemann, K. H., Eichenlaub, R. and Rajashekara, G. (2010). Bioluminescence imaging of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* infection of tomato seeds and plants. *Appl Environ Microbiol.* **76(12):** 3978-3988.

Yanisch-Perron, C., Vieira, J. and Messing, J. (1985). Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene.* **33(1):** 103-119.

Yuan, H. P., Min, H., Lv, Z. M. and Li, Z. M. (2009). Antimicrobial activity of isolate HL-12 against *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in the presence of cadmium. *Ecotoxicology.* **18(4):** 447-454.

Zgurskaya, H. I., Evtushenko, L. I., Akimov, V. N. and Kalakoutskii, L. V. (1993). *Rathayibacter* gen. nov., including the species *Rathayibacter rathayi* comb. nov., *Rathayibacter tritici* comb. nov., *Rathayibacter iranicus* comb. nov., and six strains from annual grasses. *Int J Syst Bacteriol.* **43(1):** 143-149.

Zheng, X., Hu, G. Q., She, Z. S. and Zhu, H. (2011). Leaderless genes in bacteria: clue to the evolution of translation initiation mechanisms in prokaryotes. *BMC Genomics.* **12:** 361.

7 Anhang

7.1 Plasmidkonstruktion

Die Konstruktion der Plasmide, die im Abschnitt 3.1 in Tabelle 3 aufgelistet sind, wird im Folgenden beschrieben. Schnittstellen für Restriktionsenzyme sind fett markiert.

pDM302*gfp*

Für nachfolgende Fluoreszenzmessungen wurde *gfp* aus dem Plasmid pEPR1P45*gfp* (Knoppová *et al.*, 2007) mit den Oligonukleotiden *gfp*-EcoRI-fw (5'-CG**GAATTC**ATG ATTGAACAAGAGGTA-3') und *gfp*-HindIII-rev (5'-CC**AAGCTT**TTATTTGTAGAGCTCATCC-3') amplifiziert, mit den Restriktionsenzymen EcoRI und HindIII geschnitten und in das geschnittene Plasmid pDM302 (Meletzus *et al.*, 1993) ligiert.

pDM302P*pat-1gfp*

Für die Analyse der Promotorstärke des *pat-1*-Promotors mittels GFP-Fluoreszenzmessung wurde eine 200 bp umfassende Promotorregion von *pat-1* mit den Oligonukleotiden *pat1*_prom-ScaI-fw (5'-AG**AGTACT**AGATCTCGGTTCGTTCGTAGGAG-3') und *pat1*_prom-EcoRI-rev (5'-AA**GAATTC**AGTAGCGCCCGGAACAGG-3') amplifiziert, mit den Restriktionsenzymen ScaI und EcoRI geschnitten und in den geschnittenen Vektor pDM302*gfp* ligiert.

pDM302P*glnA1gfp*

Für die Analyse der Promotorstärke des *glnA1*-Promotors mittels GFP-Fluoreszenzmessung wurde eine 200 bp umfassende Promotorregion von *glnA1* mit den Oligonukleotiden prom-1636-fw (5'-GG**AGTACT**TTCGTGGGAGTCGCG-3') und prom-1636-rev (5'-TC**GAATTC** GTCTCTGAACATGTGGTG-3') amplifiziert, mit den Restriktionsenzymen ScaI und EcoRI geschnitten und in den geschnittenen Vektor pDM302*gfp* ligiert.

pDM302P*pfkAgfp*

Für die Analyse der Promotorstärke des *pfkA*-Promotors mittels GFP-Fluoreszenzmessung wurde eine 200 bp umfassende Promotorregion von *pfkA* mit den Oligonukleotiden *pfkA*-ScaI-fw (5'-CG**AGTACT**CGCGCGAGG-3') und *pfkA*-EcoRI-rev (5'-TC**GAATTC**GCACAC GTCC-3') amplifiziert, mit den Restriktionsenzymen ScaI und EcoRI geschnitten und in den geschnittenen Vektor pDM302*gfp* ligiert.

pDrive*cat*

Zur Verbesserung der Klonierungs-Bedingungen wurde das Chloramphenicol-Resistenzgen *cat* mit den Oligonukleotiden *cmx*_KpnI_fw (5'-CC**GGTACC**ACTGCAGGACATGGTCAAAG-3') und *cmx*_SexAI_rev (5'-AA**CCTGGT**TCGGATGGGTCATCAATTGG-3') amplifiziert und in den linearen Vektor pDrive (Qiagen, Hilden) ligiert.

pUC18*cat*

Für die nachfolgende Durchführung von Insertionsmutagenese-Studien wurde das *Suizid*-Plasmid pUC18*cat* konstruiert. Dafür wurde das Chloramphenicol-Resistenzgen *cat* mit den Restriktionsenzymen AccI und SphI aus dem Plasmid pDrive*cat* geschnitten und in den geschnittenen Vektor pUC18 (Yanisch-Perron *et al.*, 1985) ligiert.

pUC18fCMM_2408*cat*

Für die nachfolgende Durchführung von Insertionsmutagenese-Studien wurde ein 480 bp großes Fragment von CMM_2408 mit den Oligonukleotiden 2408_XbaI_fw (5'-GGCC**TCTAG A**ACGATGGCGGCGAGCGGCTG-3') und 2408_XbaI_rev (5'-GGCC**TCTAGA**TAGCCCACG CTCACCGCAAC-3') amplifiziert, mit dem Restriktionsenzym XbaI geschnitten und in den geschnittenen Vektor pUC18*cat* ligiert.

pUC18fCMM_2766*cat*

Für die nachfolgende Durchführung von Insertionsmutagenese-Studien wurde ein 430 bp großes Fragment von CMM_2766 mit den Oligonukleotiden 2766_XbaI_fw (5'-GGCC**TCTAG A**CTACGAGGGCTGGCAGATCC-3') und 2766_XbaI_rev (5'-GGCC**TCTAGA**CGCATGAGGT AGCGCAGCAG-3') amplifiziert, mit dem Restriktionsenzym XbaI geschnitten und in den geschnittenen Vektor pUC18*cat* ligiert.

pUC18fpCM2_0056*cat*

Für die nachfolgende Durchführung von Insertionsmutagenese-Studien wurde ein 630 bp großes Fragment von pCM2_0056 mit den Oligonukleotiden 0056_XbaI_fw (5'-GGCC**TCTA GA**ACGGCAGAGGAACGCATCAC-3') und 0056_XbaI_rev (5'-GGCC**TCTAGA**ACCGACTC GCTGACGATCTC-3') amplifiziert, mit dem Restriktionsenzym XbaI geschnitten und in den geschnittenen Vektor pUC18*cat* ligiert.

pUC18*nptII*

Für die Herstellung einer pCM1_0056/CMM_0055-Doppelmutante wurde das Plasmid pUC18*nptII* konstruiert. Das Neomycin-Resistenzgen wurde dabei mit den Oligonukleotiden *npt*_AccI_fw (5'-GGCC**GTCGAC**CGATGGGAACCACGGAGAAG-3') und *npt*_ XbaI_rev (5'-

CCGG**TCTAGA**GCTCAGAAGAACTCGTCAAG-3‘), mit den Restriktionsenzymen AccI und XbaI geschnitten und in den geschnittenen Vektor pUC18 (Yanisch-Perron *et al.*, 1985) ligiert.

7.2 MALDI-ToF MS-Daten des extrazellulären Proteoms von *Cmm*382

Zur Analyse des extrazellulären Proteoms von *Cmm*382 in Minimalmedium M9 und in dem synthetischen Xylemsaft-imitierenden Medium XMM wurde der Medienüberstand aus 450 ml Kultur mittels MALDI-ToF Massenspektrometrie analysiert. Die Analyse erfolgte in biologischen Triplikaten. Dabei wurden 227 Proteine im Medienüberstand einer M9-Kultur identifiziert (Tabelle 19) und 160 im Medienüberstand einer XMM-Kultur (Tabelle 20). Die Einteilung der Gene von *Cmm*382 in die entsprechenden COG-Gruppen wurde aus (Flügel *et al.*, 2012) übernommen.

Tabelle 19: Mittels MALDI-ToF MS identifizierte extrazelluläre Proteine aus *Cmm*382 in Minimalmedium M9. Dargestellt sind alle 227 Proteine, die in einem oder mehreren der Replikate (1, 2 oder 3) bei der Analyse des extrazellulären Proteoms identifiziert wurden. Die entsprechenden Gene wurden nach dem absteigenden *Score*-Wert geordnet. SBP: *substrat-binding protein;* PBP: *penicillin-binding protein*.

Score	Gen-Name	mögliche Funktion	COG	Replikat-Nr.
11.300	CMM_0338	*conserved secreted protein, putative PBP*	V.2	3
3.485	CMM_0976	*ABC transporter, substrate-binding protein*	IV.1	3
1.623	CMM_2941	*metal ABC transporter, substrate-binding protein*	IV.1	2
1.507	CMM_2176	*conserved secreted lipoprotein*	IV.1	3
1.369	CMM_1921	*hypothetical secreted protein*	V.2	2
1.177	CMM_1250	*hypothetical secreted protein*	V.2	2
1.066	CMM_2478 (*groEL*)	*60 kDa chaperonin (protein Cpn60) (GroEL protein)*	IV.4	2
1.052	CMM_2536 (*sbtC*)	*subtilisin-like extracellular serine protease*	IV.6	3
1.004	CMM_0840	*NPL/P60 family secreted protein*	IV.6	3
1.000	CMM_1675	*hypothetical secreted protein*	V.2	3
781	CMM_0071 (*ppaE*)	*extracellular serine protease*	IV.6	3
762	CMM_1942 (*ppaG*)	*extracellular serine protease*	IV.6	3
756	CMM_2283	*metal ABC transporter, substrate-binding protein*	IV.1	3
679	CMM_0144	*conserved secreted protein*	V.2	3
672	CMM_0050 (*ppaB2*)	*extracellular serine protease*	IV.6	3
672	CMM_0042 (*ppaB1*)	*extracellular serine protease*	IV.6	3
635	CMM_0278	*chorismate mutase*	I.2	3
633	CMM_0764 (*ppaF*)	*extracellular serine protease*	IV.6	3
519	CMM_0919 (*pbpD*)	*penicillin-binding protein*	II.2	3
482	CMM_2434	*serine protease, family S1C*	IV.7	2
443	CMM_2931 (*fecB2*)	*iron-siderophore ABC transporter, SBP*	IV.1	2
438	CMM_2185	*peptide ABC transporter, substrate-binding protein*	IV.1	3
370	CMM_2688	*acetyl xylan esterase*	I.1	2
365	CMM_1872	*conserved secreted protein, peptidoglycan-binding*	V.2	3
365	CMM_1842 (*ctaC*)	*cytochrome c oxidase, subunit 2*	I.1	3
350	CMM_1865 (*ftsI*)	*peptidoglycan glycosyltransferase/PBP*	II.2	3
332	CMM_2263 (*eno*)	*enolase*	I.1	2
330	CMM_2537 (*icdA*)	*isocitrate dehydrogenase*	I.1	2
309	CMM_2620 (*tuf*)	*elongation factor Tu (EF-Tu)*	III.3	2
306	CMM_1736 (*pgiA*)	*glucose-6-phosphate isomerase*	I.1	2
290	CMM_1600 (*gmdA*)	*GDP-mannose 4,6-dehydratase*	II.2	1
276	CMM_2568 (*groES*)	*10 kDa chaperonin (protein Cpn10) (GroES protein)*	IV.4	2
263	CMM_0866	*alpha-glucoside ABC transporter, SBP*	IV.1	3
241	CMM_2467	*hydrolase*	V.1	3
241	CMM_0839	*membrane bound metalloprotease*	IV.7	3

Fortsetzung Tabelle 19: extrazelluläres Proteom von Cmm*382 in M9-Medium.*

239	CMM_1735 (*talA*)	*transaldolase*	I.1	2
231	pCM2_0042	*hypothetical protein*	V.2	1
202	CMM_2535 (*sbtB*)	*subtilisin-like extracellular serine protease, peptidase family S8A*	IV.6	2
197	CMM_2006 (*gluB*)	*glutamate ABC transporter, substrate-binding protein*	IV.1	3
192	CMM_0879	*sugar ABC transporter, substrate-binding protein*	IV.1	3
178	CMM_2547 (*sucD*)	*succinyl-CoA ligase [ADP-forming], subunit alpha*	I.1	1
164	pCM1_0023 (*ppaJ*)	*extracellular serine protease*	IV.6	1
150	CMM_0166 (*fhuD*)	*Fe3+-siderophore ABC transporter, SBP*	IV.1	2
148	CMM_0178	*conserved secreted protein*	V.2	2
145	CMM_1790	*anion ABC transporter, substrate-binding protein*	IV.1	2
144	CMM_2420	*peptide ABC transporter, substrate-binding protein*	IV.1	1
140	CMM_1081	*hypothetical secreted protein*	V.2	2
130	CMM_0044 (*ppaC*)	*extracellular serine protease*	IV.6	3
126	CMM_1389	*conserved secreted protein*	V.2	3
125	CMM_1611 (*cspA1*)	*cold shock protein*	IV.4	3
117	CMM_1960	*peptide ABC transporter, substrate-binding protein*	IV.1	3
113	CMM_2491	*conserved secreted protein*	V.2	2
97	CMM_0431	*hemagglutinin/hemolysin-related protein, possible cell surface protein*	IV.4	2
96	pCM2_0047	*hypothetical protein*	V.2	1
93	CMM_2628	*polar amino acid ABC transporter, SBP*	IV.1	2
93	CMM_1744 (*gapA*)	*glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*	I.1	3
92	CMM_2604 (*rpsH*)	*30S ribosomal protein S8*	III.3	2
92	CMM_0930	*proteinase*	IV.7	1
91	CMM_1659 (*acnA*)	*aconitate hydratase*	I.1	2
90	CMM_2584 (*rpoA*)	*DNA-directed RNA polymerase, subunit alpha*	III.2	1
89	CMM_1752 (*rpsA*)	*30S ribosomal protein S1*	III.3	1
87	CMM_1852	*cell division initiation protein*	II.1	1
86	CMM_0819 (*wcoA*)	*cell surface protein*	II.2	1
86	CMM_0235	*conserved secreted protein, putative bacteriocin*	V.2	1
84	CMM_1096 (*ilvC*)	*ketol-acid reductoisomerase*	I.2	1
83	CMM_1743 (*pgk*)	*phosphoglycerate kinase*	I.1	2
83	CMM_1458	*conserved hypothetical protein*	V.2	1
82	CMM_2934 (*hupB*)	*DNA-binding protein*	IV.3	2
79	CMM_0015 (*pknB*)	*serine/threonine protein kinase*	IV.3	2
79	CMM_2177	*putative Fe-dependent peroxidase*	IV.1	2
73	CMM_1641 (*aceF*)	*pyruvate/2-oxoglutarate dehydrogenase complex, dihydrolipoamide acyltransferase (E2) component*	I.1	2
72	CMM_0638	*membrane- metalloendopeptidase,subfamily M23B*	IV.7	2
72	CMM_1126	*extracellular 5'-nucleotidase*	II.2	2
66	CMM_0128	*conserved secreted protein*	V.2	2
64	CMM_0795	*extracellular nuclease/phosphatase*	IV.6	2
63	CMM_1104 (*leuB*)	*3-isopropylmalate dehydrogenase*	I.2	1
63	CMM_1948 (*ppaI*)	*extracellular serine protease*	IV.6	1
61	CMM_0931 (*pbpE*)	*D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase*	II.2	3
59	CMM_2566 (*livK*)	*branched-chain amino acid ABC transporter, SBP*	IV.1	3
57	CMM_0737 (*katA*)	*Catalase*	IV.5	1
54	CMM_2621 (*fusA*)	*elongation factor G (EF-G)*	III.3	2
54	CMM_1461 (*dpsA*)	*stress induced DNA-binding protein*	IV.5	1
53	CMM_0441	*hypothetical secreted protein*	V.2	1
52	CMM_1745 (*sodA*)	*superoxide dismutase*	IV.5	2
51	CMM_1835 (*qcrC*)	*ubiquinol-cytochrome c reductase, cytochrome c subunit*	I.1	3
51	CMM_0049 (*nagA*)	*beta-N-acetylglucosaminidase*	I.1	3
51	CMM_2548 (*sucC*)	*succinyl-CoA ligase [ADP-forming], subunit beta*	I.1	2
48	CMM_1489 (*rplU*)	*50S ribosomal protein L21*	III.3	1
46	CMM_0435 (*fepB*)	*iron-siderophore ABC transporter, SBP*	IV.1	2
46	CMM_1734 (*tktA*)	*transketolase*	I.1	2
45	CMM_1673 (*xysA*)	*endo-1,4-beta-xylanase A*	IV.6	3
44	CMM_1167 (*atpA*)	*ATP synthase, subunit alpha*	IV.1	1
43	CMM_1844	*metallopeptidase, family M20A*	IV.7	1
43	CMM_0841 (*ipyA*)	*inorganic pyrophosphatase*	I.6	1
42	CMM_2921	*conserved secreted protein*	V.2	2
41	CMM_2871 (*pgaA*)	*polygalacturonase*	IV.6	1

Fortsetzung Tabelle 19: extrazelluläres Proteom von Cmm*382 in M9-Medium.*

41	CMM_0911	*hypothetical protein (sortase-sorted)*	II.2	2
40	CMM_0861 (*rplL*)	*50S ribosomal protein L7/L12*	III.3	2
40	CMM_2522 (*glyA*)	*serine hydroxymethyltransferase*	I.2	1
40	CMM_1022 (*wcqK*)	*secreted protein*	II.2	3
39	CMM_1642 (*lpdB*)	*dihydrolipoyl dehydrogenase*	I.2	2
39	CMM_0466	*conserved secreted protein*	V.2	3
37	CMM_0109	*sugar ABC transporter, substrate-binding protein*	IV.1	1
36	CMM_1636 (*glnA1*)	*glutamine synthetase I*	I.2	2
36	CMM_0051 (*pelA2*)	*pectate lyase*	IV.6	2
36	CMM_0043 (*pelA1*)	*pectate lyase*	IV.6	2
34	CMM_0010 (*ppiA*)	*peptidyl-prolyl cis-trans isomerase*	IV.4	1
34	CMM_1384 (*tsf*)	*elongation factor Ts (EF-Ts)*	III.3	2
34	CMM_0034	*sugar phosphate isomerase/epimerase*	I.1	1
33	CMM_1278	*serine protease, family S1B*	IV.7	2
33	CMM_1836 (*qcrA*)	*menaquinol-cytochrome C reductase, iron-sulfur subunit*	I.1	2
33	CMM_1831 (*glpK*)	*glycerol kinase*	IV.1	2
32	CMM_1487	*ribonuclease*	III.2	1
32	CMM_2786 (*rplA*)	*50S ribosomal protein L1*	III.3	1
32	CMM_1383 (*rpsB*)	*30S ribosomal protein S2*	III.3	1
32	CMM_2583 (*rplQ*)	*50S ribosomal protein L17*	III.3	1
32	CMM_2088	*oxidoreductase*	V.1	1
31	CMM_1169 (*atpD*)	*ATP synthase, subunit beta*	IV.1	1
31	CMM_1599 (*fclA*)	*GDP-L-fucose synthase*	II.2	1
31	CMM_2605 (*rplE*)	*50S ribosomal protein L5*	III.3	1
30	CMM_0112	*dehydrogenase/oxidoreductase*	V.1	2
30	CMM_0035	*dehydrogenase/oxidoreductase*	V.1	2
30	CMM_0363	*Fe3+-hydroxamate ABC transporter, SBP*	IV.1	1
29	CMM_2618 (*rpsJ*)	*30S ribosomal protein S10*	III.3	2
28	CMM_0640	*conserved hypothetical protein*	I.4	1
28	CMM_1514	*conserved hypothetical protein*	V.2	1
28	CMM_2692	*endoglucanase*	IV.6	1
27	CMM_0511	*conserved secreted protein*	V.2	2
27	CMM_1203	*serine protease, ATP-dependent, protein containing a PDZ domain, family S16*	IV.7	1
27	CMM_2603 (*rplF*)	*50S ribosomal protein L6*	III.3	1
27	CMM_1532 (*proX*)	*proline/glycine/betaine/choline ABC transporter, SBP*	IV.1	2
25	CMM_1248	*hypothetical secreted protein*	V.2	1
25	CMM_0151 (*dnaK*)	*chaperone protein dnaK (heat shock protein 70)*	IV.4	2
24	CMM_0956	*peptide ABC transporter, substrate-binding protein*	IV.1	2
24	CMM_0643	*oxidoreductase*	V.1	1
24	CMM_2902	*hypothetical secreted protein*	V.2	1
24	CMM_2611 (*rpsC*)	*30S ribosomal protein S3*	III.3	1
23	CMM_0857 (*clpC*)	*ATP-dependent protease, ATPase subunit*	IV.4	1
23	CMM_0039 (*chpE*)	*extracellular serine protease, family S1A (Chymotrypsin)*	IV.6	3
23	CMM_2327	*conserved membrane protein*	V.2	1
22	CMM_0915 (*pbpC*)	*penicillin-binding protein*	II.2	2
22	CMM_2617 (*rplC*)	*50S ribosomal protein L3*	III.3	2
22	CMM_1782 (*carB*)	*carbamoyl-phosphate synthase, large chain*	I.3	1
21	CMM_1463 (*tig*)	*trigger factor (TF) (prolyl isomerase; chaperone)*	IV.4	2
21	CMM_1557	*hypothetical secreted protein*	V.2	3
20	CMM_2607 (*rplN*)	*50S ribosomal protein L14*	III.3	2
20	CMM_2609 (*rpmC*)	*50S ribosomal protein L29*	III.3	2
18	CMM_1716 (*rpmE2*)	*50S ribosomal protein L31, type B*	III.3	1
18	CMM_1703	*glycine/betaine ABC transporter, SBP*	IV.1	1
17	CMM_1764 (*trpC*)	*indole-3-glycerol phosphate synthase*	I.2	1
17	CMM_2161	*peptidyl-prolyl isomerase*	IV.4	1
17	CMM_0517	*transcriptional regulator, LytR family*	IV.3	2
17	CMM_1034	*phosphohexomutase*	I.1	1
16	CMM_1616 (*fabF*)	*3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase*	I.4	2
16	CMM_1873 (*pknE*)	*serine/threonine protein kinase, eukaryotic-type*	IV.3	1
16	CMM_2469 (*serC*)	*phosphoserine aminotransferase*	I.2	1
16	CMM_0991 (*accA*)	*acetyl/propionyl-CoA carboxylase subunit*	I.4	1
15	CMM_0132	*conserved secreted protein*	V.2	2

Fortsetzung Tabelle 19: extrazelluläres Proteom von Cmm*382 in M9-Medium.*

15	pCM2_0054 (*pat-1*)	*extracellular serine protease, family S1A (Chymotrypsin)*	IV.6	1
15	CMM_1621 (*aceE*)	*pyruvate dehydrogenase, E1 component*	I.1	1
14	pCM1_0020 (*celA*)	*cellulase*	IV.6	1
14	CMM_1490 (*rpmA*)	*50S ribosomal protein L27*	III.3	1
14	CMM_1587	*oligopeptide ABC transporter, SBP*	IV.1	1
14	CMM_0671	*conserved membrane protein*	V.2	2
13	CMM_1758 (*pykA*)	*pyruvate kinase*	I.1	2
12	CMM_2608 (*rpsQ*)	*30S ribosomal protein S17*	III.3	1
12	CMM_2614 (*rplB*)	*50S ribosomal protein L2*	III.3	2
12	CMM_1742 (*tpiA*)	*triosephosphate isomerase*	I.1	1
11	CMM_2612 (*rplV*)	*50S ribosomal protein L22*	III.3	1
11	CMM_2960 (*rplI*)	*50S ribosomal protein L9*	III.3	1
11	CMM_0608	*conserved secreted protein*	V.2	3
11	CMM_2485	*sugar ABC transporter, ATPase*	IV.1	1
11	CMM_1457 (*pepN*)	*aminopeptidase N*	I.2	2
10	CMM_2579 (*rpsI*)	*30S ribosomal protein S9*	III.3	1
10	CMM_1800	*aminodeoxychorismate lyase*	I.5	1
10	CMM_1643 (*pepA*)	*cytosol aminopeptidase*	I.2	1
10	CMM_0003 (*gndA1*)	*6-phosphogluconate dehydrogenase*	I.1	1
10	CMM_2461	*conserved hypothetical protein, putative translation factor*	III.3	1
10	CMM_1670	*oxidoreductase*	V.1	1
9	CMM_1480 (*expA*)	*expansin*	IV.6	3
9	CMM_2787 (*rplK*)	*50S ribosomal protein L11*	III.3	2
9	CMM_2963 (*rpsF*)	*30S ribosomal protein S6*	III.3	2
9	CMM_2606 (*rplX*)	*50S ribosomal protein L24*	III.3	2
9	CMM_2961 (*rpsR*)	*30S ribosomal protein S18*	III.3	1
9	CMM_0829 (*wcoK*)	*hypothetical protein*	II.2	1
9	CMM_2819	*metallopeptidase, family M13*	IV.7	1
8	CMM_0337	*conserved secreted protein, putative carboxypeptidase or PBP*	V.2	1
8	CMM_2272 (*gndA2*)	*6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating*	I.1	1
8	CMM_2349 (*fecB1*)	*Fe3+-siderophore ABC transporter, SBP*	IV.1	1
8	CMM_2033	*conserved secreted protein*	IV.1	1
7	CMM_0070 (*sbtA*)	*subtilisin-like extracellular serine protease, peptidase family S8A*	IV.6	2
7	CMM_2616 (*rplD*)	*50S ribosomal protein L4*	III.2	1
7	CMM_2600 (*rpmD*)	*50S ribosomal protein L30*	III.3	2
7	CMM_2599 (*rplO*)	*50S ribosomal protein L15*	III.3	1
6	CMM_1322 (*sucA*)	*2-oxoglutarate dehydrogenase, E1 component*	I.1	1
6	CMM_2733	*sugar ABC transporter, substrate-binding protein*	IV.1	1
5	CMM_2788 (*nusG*)	*transcription antitermination protein*	III.2	1
5	CMM_0595 (*hemH*)	*ferrochelatase*	I.5	1
5	CMM_2693	*conserved secreted protein*	V.2	2
5	CMM_1105 (*ilvE*)	*branched-chain amino acid aminotransferase*	I.2	1
5	CMM_2937 (*rpmB*)	*50S ribosomal protein L28*	III.3	1
5	CMM_1884	*transcriptional regulator, with FHA domain*	IV.3	1
4	CMM_0989 (*punA*)	*purine nucleoside phosphorylase*	I.3	1
4	CMM_2479 (*cspA2*)	*cold shock protein*	IV.4	1
4	CMM_2615 (*rplW*)	*50S ribosomal protein L23*	III.3	1
4	CMM_1551 (*rpsT*)	*30S ribosomal protein S20*	III.3	1
4	CMM_1996 (*argG*)	*argininosuccinate synthase*	I.2	1
4	CMM_0486	*conserved hypothetical protein, putative general stress protein*	IV.4	1
4	CMM_2610 (*rplP*)	*50S ribosomal protein L16*	III.3	2
4	CMM_2233 (*fumC*)	*fumarate hydratase*	I.1	2
4	CMM_1526	*oxidoreductase*	V.1	1
4	CMM_0709	*stress-induced protein, putative organic hydroperoxide resistance protein*	IV.5	1
4	CMM_1473 (*pckA*)	*phosphoenolpyruvate carboxykinase*	I.1	1
3	CMM_1411	*conserved secreted protein*	V.2	1
3	CMM_1730	*putative Fe-S cluster assembly protein, ABC transporter*	IV.5	1

Fortsetzung Tabelle 19: extrazelluläres Proteom von Cmm*382 in M9-Medium.*

3	CMM_0903 (*asdA*)	*aspartate-semialdehyde dehydrogenase*	I.2	1
2	CMM_0872 (*cysB*)	*cystathionine beta-synthase*	I.2	1
2	CMM_1521	*transcriptional regulator, LytR family*	IV.3	1
2	CMM_2169	*surface protein, putative RTX toxin*	II.2	1
2	CMM_2709	*secreted metallopeptidase, family M23*	IV.6	1
2	CMM_0969 (*sdhB*)	*succinate dehydrogenase, iron-sulfur protein*	I.1	1
2	CMM_0560	*transcriptional regulator*	IV.3	1
2	CMM_2252	*conserved secreted protein*	V.2	1

Tabelle 20: Mittels MALDI-ToF MS identifizierte extrazelluläre Proteine aus *Cmm*382 in dem synthetischen Medium XMM. Dargestellt sind alle 160 Proteine, die in einem oder mehreren der Replikate (1, 2 oder 3) bei der Analyse des extrazellulären Proteoms identifiziert wurden. Die entsprechenden Gene wurden nach dem absteigenden *Score*-Wert geordnet. SBP: *substrat-binding protein;* PBP: *penicillin-binding protein*.

Score	**Gen-Name**	**mögliche Funktion**	**COG**	**Replikat-Nr.**
5.427	CMM_1675	*hypothetical secreted protein*	V.2	3
1.307	CMM_0338	*conserved secreted protein, putative PBP*	V.2	3
1.039	CMM_0976	*ABC transporter, substrate-binding protein*	IV.1	3
910	CMM_1557	*hypothetical secreted protein*	V.2	3
873	CMM_1872	*conserved secreted protein, peptidoglycan-binding*	V.2	3
612	CMM_0866	*alpha-glucoside ABC transporter, SBP*	IV.1	3
474	CMM_1126	*extracellular 5'-nucleotidase*	II.2	2
431	CMM_2536 (*sbtC*)	*subtilisin-like extracellular serine protease, peptidase family S8A*	IV.6	3
422	CMM_0764 (*ppaF*)	*extracellular serine protease*	IV.6	2
385	pCM2_0053 (*phpA*)	*extracellular serine protease, family S1A*	IV.6	1
385	pCM1_0023 (*ppaJ*)	*extracellular serine protease*	IV.6	1
385	CMM_1948 (*ppaI*)	*extracellular serine protease*	IV.6	1
385	CMM_1947 (*ppaH*)	*extracellular serine protease*	IV.6	1
353	CMM_0840	*NPL/P60 family secreted protein*	IV.6	3
326	CMM_0919 (*pbpD*)	*penicillin-binding protein*	II.2	3
326	CMM_0915 (*pbpC*)	*penicillin-binding protein*	II.2	3
324	CMM_0795	*extracellular nuclease/phosphatase*	IV.6	3
318	CMM_1921	*hypothetical secreted protein*	V.2	2
302	CMM_1865 (*ftsI*)	*peptidoglycan glycosyltransferase/PBP*	II.2	3
264	CMM_0839	*membrane bound metalloprotease*	IV.7	3
256	CMM_2478 (*groEL*)	*60 kDa chaperonin (protein Cpn60) (GroEL protein)*	IV.4	2
205	CMM_0050 (*ppaB2*)	*extracellular serine protease*	IV.6	3
205	CMM_0042 (*ppaB1*)	*extracellular serine protease*	IV.6	3
199	CMM_1250	*hypothetical secreted protein*	V.2	3
181	CMM_1842 (*ctaC*)	*cytochrome c oxidase, subunit 2*	I.1	3
180	CMM_2688	*acetyl xylan esterase*	I.1	3
172	pCM2_0042	*hypothetical protein*	V.2	1
166	CMM_2185	*peptide ABC transporter, substrate-binding protein*	IV.1	3
165	CMM_2467	*hydrolase*	V.1	3
149	CMM_1611 (*cspA1*)	*cold shock protein*	IV.4	2
138	CMM_2283	*metal ABC transporter, substrate-binding protein*	IV.1	3
134	pCM2_0054 (*pat-1*)	*extracellular serine protease, family S1A*	IV.6	1
125	CMM_1641 (*pknD*)	*pyruvate/2-oxoglutarate dehydrogenase complex, dihydrolipoamide acyltransferase (E2) component*	I.1	1
123	CMM_2537 (*icdA*)	*isocitrate dehydrogenase*	I.1	1
108	CMM_2568 (*groES*)	*10 kDa chaperonin (protein Cpn10) (GroES protein)*	IV.4	3
107	pCM2_0047	*hypothetical protein*	V.2	1
105	CMM_2535 (*sbtB*)	*subtilisin-like extracellular serine protease, peptidase family S8A*	IV.6	3
103	CMM_2566 (*livK*)	*branched-chain amino acid ABC transporter, SBP*	IV.1	3
101	CMM_0245	*hypothetical secreted protein (sortase-sorted)*	II.2	1
101	CMM_2787 (*rplK*)	*50S ribosomal protein L11*	III.3	1
99	CMM_2006 (*gluB*)	*glutamate ABC transporter, substrate-binding protein*	IV.1	2
93	CMM_0144	*conserved secreted protein*	V.2	3
92	CMM_0511	*conserved secreted protein*	V.2	3

Fortsetzung Tabelle 20: extrazelluläres Proteom von Cmm*382 in XMM-Medium.*

84	CMM_0879	*sugar ABC transporter, substrate-binding protein*	IV.1	3
73	CMM_2161	*peptidyl-prolyl isomerase*	IV.4	3
71	CMM_0819 (*wcoA*)	*cell surface protein*	II.2	3
71	CMM_2934 (*hupB*)	*DNA-binding protein*	IV.3	1
67	CMM_2562 (*livH*)	*branched-chain amino acid ABC transporter, permease protein*	IV.1	3
67	CMM_0044 (*ppaC*)	*extracellular serine protease*	IV.6	3
66	CMM_0071 (*ppaE*)	*extracellular serine protease*	IV.6	3
61	CMM_2204	*conserved secreted protein, putative glycosyl hydrolase containing sensor domain*	V.2	2
61	CMM_0638	*membrane- metalloendopeptidase,subfamily M23B*	IV.7	3
57	pCM1_0020 (*celA*)	*cellulase*	IV.6	1
57	CMM_0039 (*chpE*)	*extracellular serine protease, family S1A*	IV.6	1
56	CMM_1022 (*wcqK*)	*secreted protein*	II.2	3
56	CMM_0466	*conserved secreted protein*	V.2	3
56	CMM_0431	*hemagglutinin/hemolysin-related protein, possible cell surface protein*	IV.4	3
52	CMM_1673 (*xysA*)	*endo-1,4-beta-xylanase A*	IV.6	2
52	CMM_2540	*hypothetical secreted protein*	V.2	2
51	CMM_0931 (*pbpE*)	*D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase*	II.2	3
51	CMM_2609 (*rpmC*)	*50S ribosomal protein L29*	III.3	1
51	CMM_1790	*anion ABC transporter, substrate-binding protein*	IV.1	3
49	CMM_0608	*conserved secreted protein*	V.2	2
47	CMM_0278	*chorismate mutase*	I.2	3
45	CMM_1835 (*qcrC*)	*ubiquinol-cytochrome c reductase, cytochrome c subunit*	I.1	2
44	CMM_1942 (*ppaG*)	*extracellular serine protease*	IV.6	3
43	CMM_1800 (*aroE*)	*aminodeoxychorismate lyase*	I.5	3
43	CMM_1389	*conserved secreted protein*	V.2	2
42	CMM_0049 (*nagA*)	*beta-N-acetylglucosaminidase*	I.1	3
41	CMM_2618 (*rpsJ*)	*30S ribosomal protein S10*	III.3	1
41	CMM_2263 (*eno*)	*enolase*	I.1	2
41	CMM_0128	*conserved secreted protein*	V.2	2
39	CMM_2434	*serine protease, family S1C*	IV.7	3
38	CMM_0132	*conserved secreted protein*	V.2	2
35	CMM_1744 (*gapA*)	*glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*	I.1	2
35	CMM_1960	*peptide ABC transporter, substrate-binding protein*	IV.1	2
33	CMM_2033	*conserved secreted protein*	IV.1	2
33	CMM_0051 (*pelA2*)	*pectate lyase*	IV.6	2
33	CMM_0043 (*pelA1*)	*pectate lyase*	IV.6	2
32	CMM_2617 (*rplC*)	*50S ribosomal protein L3*	III.3	2
29	CMM_2604 (*rpsH*)	*30S ribosomal protein S8*	III.3	2
28	CMM_1852	*cell division initiation protein*	II.1	1
28	CMM_0486	*putative general stress protein*	IV.4	1
28	CMM_1736 (*pgiA*)	*glucose-6-phosphate isomerase*	I.1	2
28	CMM_0627	*cell-wall associated protein*	II.2	3
27	CMM_1735 (*talA*)	*transaldolase*	I.1	1
27	CMM_2250	*hypothetical membrane protein, putative cell-surface protein*	V.2	2
26	CMM_2176	*conserved secreted lipoprotein*	IV.1	3
26	CMM_1104 (*leuB*)	*3-isopropylmalate dehydrogenase*	I.2	1
25	pCM2_0016	*putative peptidoglycan lytic enzyme*	IV.2	1
25	CMM_2438	*L-arabinose ABC transporter, SBP*	IV.1	1
25	CMM_1674 (*xysB*)	*endo-1,4-beta-xylanase B*	IV.6	1
24	CMM_0861 (*rplL*)	*50S ribosomal protein L7/L12*	III.3	2
24	CMM_2607 (*rplN*)	*50S ribosomal protein L14*	III.3	2
24	CMM_0337	*conserved secreted protein, putative carboxypeptidase or PBP*	V.2	3
24	CMM_1405	*conserved secreted protein*	V.2	1
23	CMM_2585 (*rpsK*)	*30S ribosomal protein S11*	III.3	1
23	CMM_2606 (*rplX*)	*50S ribosomal protein L24*	III.3	1
22	CMM_2252	*conserved secreted protein*	V.2	2
22	CMM_0589	*conserved hypothetical protein*	I.5	1
21	CMM_0560	*transcriptional regulator*	IV.3	3

Fortsetzung Tabelle 20: extrazelluläres Proteom von Cmm*382 in XMM-Medium.*

20	CMM_1532 (*proX*)	*proline/glycine/betaine/choline ABC transporter, SBP*	IV.1	2
20	CMM_2620 (*tuf*)	*elongation factor Tu (EF-Tu)*	III.3	2
20	CMM_2608 (*rpsQ*)	*30S ribosomal protein S17*	III.3	1
20	CMM_2579 (*rpsI*)	*30S ribosomal protein S9*	III.3	1
18	CMM_1248	*hypothetical secreted protein*	V.2	2
18	CMM_1758 (*pykA*)	*pyruvate kinase*	I.1	1
17	CMM_1716 (*rpmE2*)	*50S ribosomal protein L31, type B*	III.3	1
17	CMM_1409 (*gatB*)	*aspartyl/glutamyl-tRNA(Asn/Gln) amidotransferase, subunit B*	III.3	1
16	CMM_2048 (*rpsO*)	*30S ribosomal protein S15*	III.3	1
16	CMM_2610 (*rplP*)	*50S ribosomal protein L16*	III.3	1
16	CMM_1278	*serine protease, family S1B*	IV.7	2
15	CMM_2963 (*rpsF*)	*30S ribosomal protein S6*	III.3	1
15	pCM2_0035 (*rhsA*)	*rhs related protein*	II.2	1
15	CMM_2676 (*blaC*)	*beta-lactamase*	IV.5	1
15	CMM_1745 (*sodA*)	*superoxide dismutase*	IV.5	1
14	pCM2_0052 (*phpB*)	*extracellular serine protease, family S1A*	IV.6	1
13	CMM_1136	*conserved hypothetical protein*	V.2	1
13	CMM_1367 (*rpsP*)	*30S ribosomal protein S16*	III.3	1
12	CMM_1642 (*ipdB*)	*dihydrolipoyl dehydrogenase*	I.1	2
12	CMM_2462	*transcriptional regulator, histone-like protein*	IV.3	1
11	CMM_1490 (*rpmA*)	*50S ribosomal protein L27*	III.3	1
11	CMM_0737 (*katA*)	*catalase*	IV.5	1
11	CMM_2614 (*rplB*)	*50S ribosomal protein L2*	III.3	1
10	CMM_0517	*transcriptional regulator, LytR family*	IV.3	2
10	CMM_0911	*hypothetical protein (sortase-sorted)*	II.2	3
10	CMM_2600 (*rpmD*)	*50S ribosomal protein L30*	III.3	1
10	CMM_2783	*sugar ABC transporter, substrate-binding protein*	IV.1	2
10	CMM_2584 (*rpoA*)	*DNA-directed RNA polymerase, subunit alpha*	III.2	1
9	CMM_2622 (*rpsG*)	*30S ribosomal protein S7*	III.3	1
9	CMM_1383 (*rpsB*)	*30S ribosomal protein S2*	III.3	1
9	CMM_1831 (*glpK*)	*glycerol kinase*	IV.1	1
8	CMM_1587	*oligopeptide ABC transporter, SBP*	IV.1	2
8	CMM_1373 (*rplS*)	*50S ribosomal protein L19*	III.3	1
7	CMM_0441	*hypothetical secreted protein*	V.2	2
7	CMM_2616 (*rplD*)	*50S ribosomal protein L4*	III.3	2
7	CMM_2431	*hypothetical secreted protein*	V.2	1
7	CMM_1180	*conserved hypothetical protein*	V.2	1
7	CMM_1357 (*rpmF*)	*50S ribosomal protein L32*	III.3	1
6	CMM_2599 (*rplO*)	*50S ribosomal protein L15*	III.3	1
6	CMM_0429	*conserved secreted protein*	V.2	1
6	CMM_2936 (*rpmG*)	*50S ribosomal protein L33*	III.3	1
5	CMM_1480 (*expA*)	*expansin*	IV.6	3
5	CMM_2960 (*rplI*)	*50S ribosomal protein L9*	III.3	1
5	CMM_2226 (*fbaA*)	*fructose-bisphosphate aldolase*	I.1	2
5	CMM_1521	*transcriptional regulator, LytR family*	IV.3	1
5	CMM_1485 (*ndkA*)	*nucleoside diphosphate kinase*	I.3	1
5	CMM_2491	*conserved secreted protein*	V.2	1
4	CMM_2583 (*rplQ*)	*50S ribosomal protein L17*	III.3	2
4	CMM_1463 (*tig*)	*trigger factor (TF) (prolyl isomerase; chaperone)*	IV.4	2
4	CMM_1636 (*glnA1*)	*glutamine synthetase I*	I.2	1
4	CMM_0151 (*dnaK*)	*chaperone protein dnaK (heat shock protein 70)*	IV.4	2
4	CMM_1819	*putatively involved in pyridoxine biosynthesis*	I.5	1
3	CMM_1752 (*rpsA*)	*30S ribosomal protein S1*	III.3	1
3	CMM_2602 (*rplR*)	*50S ribosomal protein L18*	III.3	1
3	CMM_2775	*conserved hypothetical protein*	V.2	1
2	CMM_1384 (*tsf*)	*elongation factor Ts (EF-Ts)*	III.3	2
2	CMM_2177	*putative Fe-dependent peroxidase*	IV.1	1
2	CMM_1734 (*tktA*)	*transketolase*	I.1	1
2	pCM2_0007	*conserved hypothetical protein*	V.2	1

7.3 MALDI-ToF MS-Daten des zytoplasmatischen Proteoms von *Cmm*382

Zur Analyse des zytoplasmatischen Proteoms von *Cmm*382 in Minimalmedium M9 und in dem synthetischen Xylemsaft-imitierenden Medium XMM wurden die Bakterienzellen aus 450 ml Kultur aufgeschlossen und die Proteine nach der Fällung mit 10 % (w/v) Trichloressigsäure mittels MALDI-ToF Massenspektrometrie analysiert. Die Analyse erfolgte in biologischen Triplikaten. Dabei wurden 276 Proteine in der M9-Kultur identifiziert (Tabelle 19) und 335 in der XMM-Kultur (Tabelle 20). Die Einteilung der Gene von *Cmm*382 in die entsprechenden COG-Gruppen wurde aus (Flügel *et al.*, 2012) übernommen.

Tabelle 21: Mittels MALDI-ToF MS identifizierte zytoplasmatische Proteine aus *Cmm*382 in Minimalmedium M9. Dargestellt sind alle 276 Proteine, die in einem oder mehreren Replikaten (1, 2 oder 3) bei der Analyse des zytoplasmatischen Proteoms identifiziert wurden. Die entsprechenden Gene wurden nach dem absteigenden *Score*-Wert geordnet. SBP: *substrat-binding protein;* PBP: *penicillin-binding protein*.

Score	Gen-Name	mögliche Funktion	COG	Replikat-Nr.
1.742	CMM_2478 (*groEL)*	*60 kDa chaperonin (protein Cpn60) (GroEL protein)*	IV.4	3
807	CMM_2934 (*hupB*)	*DNA-binding protein*	IV.3	3
661	CMM_2263 (*eno*)	*enolase (2-phosphoglycerate dehydratase)*	I.1	3
660	CMM_2620 (*tuf*)	*elongation factor Tu (EF-Tu)*	III.3	3
601	CMM_0861 (*rplL*)	*50S ribosomal protein L7/L12*	III.3	3
525	CMM_1600 (*gmdA*)	*GDP-mannose 4,6-dehydratase*	II.2	3
497	CMM_2547 (*sucD*)	*succinyl-CoA ligase [ADP-forming], subunit alpha*	I.1	3
488	CMM_1744 (*gapA*)	*glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*	I.1	3
393	CMM_2568 (*groES*)	*10 kDa chaperonin (protein Cpn10) (GroES protein)*	IV.4	3
374	CMM_1735 (*talA*)	*transaldolase*	I.1	3
366	CMM_1611 (*cspA1*)	*cold shock protein*	IV.4	3
366	CMM_1489 (*rplU*)	*50S ribosomal protein L21*	III.3	3
338	CMM_2604 (*rpsH*)	*30S ribosomal protein S8*	III.3	3
301	CMM_2583 (*rplQ*)	*50S ribosomal protein L17*	III.3	3
288	CMM_0737 (*katA*)	*Catalase*	IV.5	3
278	CMM_2537 (*icdA*)	*isocitrate dehydrogenase*	I.1	3
269	CMM_0166 (*fhuD*)	*Fe3+-siderophore ABC transporter, SBP*	IV.1	1
250	CMM_2775	*conserved hypothetical protein*	V.2	1
210	CMM_2599 (*rplO*)	*50S ribosomal protein L15*	III.3	3
203	CMM_0860 (*rplJ*)	*50S ribosomal protein L10*	III.3	1
193	CMM_2773	*putative nitroreductase*	V.2	1
191	CMM_2611 (*rpsC*)	*30S ribosomal protein S3*	III.3	1
188	CMM_0009	*hypothetical protein*	V.2	1
183	CMM_1094 (*ilvB*)	*acetolactate synthase*	I.2	1
182	CMM_1757	*response regulator involved in antitermination*	IV.3	1
179	CMM_1736 (*pgiA*)	*glucose-6-phosphate isomerase*	I.1	3
175	CMM_2968 (*trxA*)	*thioredoxin reductase*	IV.5	1
171	CMM_2316	*putative phosphomutase/lyase*	V.2	3
170	CMM_1100 (*serA*)	*D-3-phosphoglycerate dehydrogenase*	I.2	1
166	CMM_1458	*conserved hypothetical protein*	V.2	2
158	CMM_0010 (*ppiA*)	*peptidyl-prolyl cis-trans isomerase*	IV.4	3
157	CMM_1636 (*glnA1*)	*glutamine synthetase I*	I.2	3
148	CMM_2233 (*fumC*)	*fumarate hydratase*	I.1	1
148	CMM_2495 (*gpmA*)	*2,3-bisphosphoglycerate-dependent phosphoglycerate mutase (phosphoglyceromutase)*	I.1	3
145	CMM_2621 (*fusA*)	*elongation factor G (EF-G)*	III.3	1
143	CMM_2226 (*fbaA*)	*fructose-bisphosphate aldolase*	I.1	3
142	CMM_2462	*transcriptional regulator, histone-like protein*	IV.3	1
140	CMM_2579 (*rpsI*)	*30S ribosomal protein S9*	III.3	3
138	CMM_0151 (*dnaK*)	*chaperone protein dnaK (heat shock protein 70)*	IV.4	3
137	CMM_1743 (*pgk*)	*phosphoglycerate kinase*	I.1	3
135	CMM_1844	*metallopeptidase, family M20A*	IV.7	3

Fortsetzung Tabelle 21: zytoplasmatisches Proteom von Cmm*382 in M9-Medium.*

135	CMM_2548 (*sucC*)	*succinyl-CoA ligase [ADP-forming], subunit beta*	I.1	1
132	CMM_1852	*cell division initiation protein*	II.1	1
126	CMM_2608 (*rpsQ*)	*30S ribosomal protein S17*	III.3	3
124	CMM_1112	*potassium channel protein, beta subunit*	IV.1	1
121	CMM_1367 (*rpsP*)	*30S ribosomal protein S16*	III.3	3
118	CMM_2617 (*rplC*)	*50S ribosomal protein L3*	III.3	3
117	CMM_1485 (*ndkA*)	*nucleoside diphosphate kinase*	I.3	1
115	CMM_0003 (*gndA1*)	*6-phosphogluconate dehydrogenase*	I.1	3
115	CMM_1764 (*trpC*)	*indole-3-glycerol phosphate synthase*	I.2	1
111	CMM_2960 (*rplI*)	*50S ribosomal protein L9*	III.3	3
110	CMM_1758 (*pykA*)	*pyruvate kinase*	I.1	3
103	CMM_1616 (*fabF*)	*3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase*	I.4	3
101	CMM_2601 (*rpsE*)	*30S ribosomal protein S5*	III.3	1
100	CMM_1779 (*rpoZ*)	*DNA-directed RNA polymerase, subunit omega*	III.2	1
98	CMM_2554 (*guaA*)	*GMP synthase*	I.3	1
97	CMM_1205	*peroxiredoxin*	IV.5	1
97	CMM_1154 (*thrC*)	*threonine synthase*	I.2	1
97	CMM_0841 (*ipyA*)	*inorganic pyrophosphatase*	I.6	3
95	CMM_1096 (*ilvC*)	*ketol-acid reductoisomerase*	I.2	3
94	CMM_2606 (*rplX*)	*50S ribosomal protein L24*	III.3	3
93	CMM_1642 (*lpdB*)	*dihydrolipoyl dehydrogenase*	I.1	1
93	CMM_2622 (*rpsG*)	*30S ribosomal protein S7*	III.3	3
93	CMM_0991 (*accA*)	*acetyl/propionyl-CoA carboxylase subunit*	I.4	1
92	CMM_2487	*tRNA/rRNA methyltransferase*	III.3	1
90	CMM_1169 (*atpD*)	*ATP synthase, subunit beta (F-ATPase subunit beta)*	IV.1	3
86	CMM_1465 (*clpP2*)	*ATP-dependent Clp protease, proteolytic subunit*	IV.4	3
86	CMM_2774	*conserved hypothetical protein*	V.2	1
83	CMM_1734 (*tktA*)	*transketolase*	I.1	1
81	CMM_0338	*conserved secreted protein, putative PBP*	V.2	1
81	CMM_1384 (*tsf*)	*elongation factor Ts (EF-Ts)*	III.3	3
77	CMM_1082	*putative monooxygenase involved in AB biosynthesis*	IV.5	1
76	CMM_2787 (*rplK*)	*50S ribosomal protein L11*	III.3	1
75	CMM_1752 (*rpsA*)	*30S ribosomal protein S1*	III.3	1
75	CMM_2613 (*rpsS*)	*30S ribosomal protein S19*	III.3	1
74	CMM_2609 (*rpmC*)	*50S ribosomal protein L29*	III.3	3
74	CMM_2616 (*rplD*)	*50S ribosomal protein L4*	III.3	3
74	CMM_1383 (*rpsB*)	*30S ribosomal protein S2*	III.3	1
73	CMM_2584 (*rpoA*)	*DNA-directed RNA polymerase, subunit alpha*	III.2	3
72	CMM_2974	*DNA/RNA binding protein*	V.1	1
71	CMM_2047 (*pnp*)	*polyribonucleotide nucleotidyltransferase*	III.3	1
65	CMM_1020 (*glfA*)	*UDP-galactopyranose mutase*	II.2	3
64	CMM_0561 (*aspS*)	*aspartyl-tRNA synthetase*	III.3	1
64	CMM_1166 (*atpH*)	*ATP synthase delta chain*	IV.1	1
63	CMM_2605 (*rplE*)	*50S ribosomal protein L5*	III.3	3
62	CMM_1738 (*opcA*)	*glucose-6-P dehydrogenase effector*	I.1	1
61	CMM_1136	*conserved hypothetical protein*	V.2	1
60	CMM_2610 (*rplP*)	*50S ribosomal protein L16*	III.3	3
58	CMM_1819	*putatively involved in pyridoxine biosynthesis*	I.5	3
58	CMM_1104 (*leuB*)	*3-isopropylmalate dehydrogenase*	I.2	1
58	CMM_1135	*F420-dependent NADP reductase*	V.1	1
56	CMM_1657	*conserved hypothetical protein*	V.2	1
56	CMM_0873 (*metB*)	*cystathionine gamma-synthase*	I.2	1
54	CMM_2615 (*rplW*)	*50S ribosomal protein L23*	III.3	2
54	CMM_0903 (*asdA*)	*aspartate-semialdehyde dehydrogenase*	I.2	1
54	CMM_1641 (*aceF*)	*pyruvate/2-oxoglutarate dehydrogenase complex, dihydrolipoamide acyltransferase (E2) component*	I.1	3
53	CMM_1278	*serine protease, family S1B*	IV.7	1
53	CMM_2600 (*rpmD*)	*50S ribosomal protein L30*	III.3	1
53	CMM_2461	*putative translation factor*	III.3	3
53	CMM_0643	*oxidoreductase*	V.1	3
52	CMM_0921	*endoribonuclease, translation initiation inhibitor*	III.3	1
51	CMM_1409 (*gatB*)	*aspartyl/glutamyl-tRNA(Asn/Gln) amidotransferase, subunit B*	III.3	1
49	CMM_1772	*peptidyl-prolyl cis-trans isomerase*	IV.4	1
48	CMM_1526	*oxidoreductase*	V.1	3

Fortsetzung Tabelle 21: zytoplasmatisches Proteom von Cmm*382 in M9-Medium.*

48	CMM_0594	*putative heme peroxidase*	I.5	1
47	CMM_1408 (*gatA*)	*glutamyl-tRNA(Gln) amidotransferase, subunit A*	III.3	1
47	CMM_2612 (*rplV*)	*50S ribosomal protein L22*	III.3	3
47	CMM_2603 (*rplF*)	*50S ribosomal protein L6*	III.3	3
46	CMM_1386 (*frr*)	*ribosome-recycling factor (ribosome-releasing factor)*	III.3	1
46	CMM_1357 (*rpmF*)	*50S ribosomal protein L32*	III.3	3
46	CMM_1461 (*dpsA*)	*stress induced DNA-binding protein*	IV.5	1
44	CMM_2586 (*rpsM*)	*30S ribosomal protein S13*	III.3	3
44	CMM_1463 (*tig*)	*trigger factor (TF) (prolyl isomerase; chaperone)*	IV.4	3
43	CMM_2786 (*rplA*)	*50S ribosomal protein L1*	III.3	3
43	CMM_2088	*oxidoreductase*	V.1	1
43	CMM_2522 (*glyA*)	*serine hydroxymethyltransferase*	I.2	3
42	CMM_0179	*NAD-dependent aldehyde dehydrogenase*	V.1	1
42	CMM_1951	*glycine betaine aldehyde dehydrogenase*	I.1	2
42	CMM_2446 (*galU*)	*UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase*	I.1	3
42	CMM_1167 (*atpA*)	*ATP synthase (F-ATPase subunit alpha)*	IV.1	3
41	CMM_1466	*monooxygenase*	V.1	1
40	CMM_2614 (*rplB*)	*50S ribosomal protein L2*	III.3	3
40	CMM_0879	*sugar ABC transporter, substrate-binding protein*	IV.1	1
40	pCM2_0036	*transcriptional regulator, histone-like protein*	IV.3	1
40	CMM_1996 (*argG*)	*argininosuccinate synthase (citrulline-aspartate ligase)*	I.2	1
40	CMM_1034	*phosphohexomutase*	I.1	3
40	CMM_0932 (*pncA*)	*pyrazinamidase/nicotinamidase*	I.5	1
40	CMM_1806	*hypothetical protein*	V.2	1
39	CMM_2048 (*rpsO*)	*30S ribosomal protein S15*	III.3	1
39	CMM_2788 (*nusG*)	*transcription antitermination protein*	III.2	1
39	CMM_1817	*conserved hypothetical protein*	V.2	1
39	CMM_2370 (*metS*)	*methionyl-tRNA synthetase*	III.3	1
38	CMM_2607 (*rplN*)	*50S ribosomal protein L14*	III.3	3
38	CMM_0513 (*pgmA*)	*phosphoglucomutase*	I.1	1
38	CMM_2623 (*rpsL*)	*30S ribosomal protein S12*	III.3	1
38	CMM_2618 (*rpsJ*)	*30S ribosomal protein S10*	III.3	3
37	CMM_1105 (*ilvE*)	*branched-chain amino acid aminotransferase*	I.2	3
35	CMM_1745 (*sodA*)	*superoxide dismutase*	IV.5	3
35	CMM_0866	*alpha-glucoside ABC transporter, SBP*	IV.1	1
35	CMM_1514	*conserved hypothetical protein*	V.2	1
35	CMM_0877 (*araD*)	*L-ribulose-5-phosphate 4-epimerase*	I.1	1
34	CMM_2963 (*rpsF*)	*30S ribosomal protein S6*	III.3	3
34	CMM_2602 (*rplR*)	*50S ribosomal protein L18*	III.3	3
33	CMM_1407 (*gatC*)	*glutamyl-tRNA(Gln) amidotransferase, subunit C*	III.3	1
32	CMM_2962 (*ssb*)	*single-stranded DNA-binding protein*	III.1	3
31	CMM_2232 (*cynT*)	*carbonic anhydrase*	I.6	1
31	CMM_2468 (*dtxR*)	*iron-dependent repressor, Dtx family*	IV.3	1
30	CMM_1010 (*rmlB*)	*dTDP-glucose 4,6-dehydratase*	II.2	1
30	CMM_2631 (*rpoB*)	*DNA-directed RNA polymerase, subunit beta*	III.2	1
30	CMM_1062 (*bcp*)	*alkyl hydroperoxide reductase*	IV.5	1
28	CMM_2045	*putative phospholipid-binding protein*	V.2	3
28	CMM_1777 (*metK*)	*S-adenosylmethionine synthetase*	I.5	2
28	CMM_2009 (*rplT*)	*50S ribosomal protein L20*	III.3	3
28	CMM_0896 (*ackA*)	*acetate kinase*	I.1	1
27	CMM_2270 (*rplY*)	*50S ribosomal protein L25*	III.3	3
26	CMM_0894	*nucleoside-diphosphate-sugar epimerase*	I.1	1
26	CMM_1150 (*argS*)	*arginyl-tRNA synthetase*	III.3	1
25	CMM_2035 (*dapA*)	*dihydrodipicolinate synthase*	I.2	1
25	CMM_1618 (*fabH*)	*3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase III*	I.4	1
25	CMM_2943	*2-keto acid dehydrogenase, E1 beta component*	I.1	1
24	CMM_1617 (*acpP*)	*acyl carrier protein*	I.4	1
24	CMM_0796 (*trxC*)	*thioredoxin*	IV.5	1
24	CMM_2880	*conserved hypothetical protein*	V.2	1
23	CMM_2185	*peptide ABC transporter, substrate-binding protein*	IV.1	1
23	CMM_1863 (*murF*)	*UDP-N-acetylmuramoyl-tripeptide-D-alanyl-D-alanine ligase*	II.2	1
23	CMM_2163 (*gabT*)	*4-aminobutyrate aminotransferase*	I.2	1
23	CMM_0152 (*grpE*)	*heat shock chaperone*	IV.4	1

Fortsetzung Tabelle 21: zytoplasmatisches Proteom von Cmm*382 in M9-Medium.*

22	CMM_0709	*stress-induced protein, putative organic hydroperoxide resistance protein*	IV.5	1
22	CMM_0589	*conserved hypothetical protein*	I.5	1
22	CMM_1856 (*ftsZ*)	*cell division protein*	II.1	1
22	CMM_1716 (*rpmE2*)	*50S ribosomal protein L31, type B*	III.3	1
21	CMM_0872 (*cysB*)	*cystathionine beta-synthase*	I.2	1
21	CMM_0812	*aldehyde dehydrogenase*	V.1	1
21	CMM_1742 (*tpiA*)	*triosephosphate isomerase*	I.1	3
21	CMM_2944	*2-keto acid dehydrogenase, E1 beta component*	I.1	2
21	CMM_2898 (*aldA*)	*L-alanine dehydrogenase*	I.2	1
21	CMM_2223	*GTP-binding protein, obg family*	III.3	1
20	CMM_2914	*putative NADPH-dependent FMN reductase*	V.2	1
20	CMM_0587 (h*emE*)	*uroporphyrinogen decarboxylase*	I.5	1
19	CMM_2961 (*rpsR*)	*30S ribosomal protein S18*	III.3	1
19	CMM_1385 (*pyrH*)	*uridylate kinase*	I.3	1
19	CMM_2831	*nucleoside-diphosphate-sugar epimerase*	I.1	1
19	CMM_1634 (*glnA2*)	*glutamine synthetase II*	I.2	1
19	CMM_1804 (*rpsD*)	*30S ribosomal protein S4*	III.3	3
18	CMM_1373 (*rplS*)	*50S ribosomal protein L19*	III.3	1
18	CMM_0858 (*galE2*)	*UDP-glucose 4-epimerase*	I.1	1
18	CMM_1654	*conserved hypothetical protein*	V.2	1
18	CMM_1696	*metallopeptidase, family M20A*	IV.7	1
17	CMM_0689 (*purA*)	*adenylosuccinate synthetase*	I.3	1
17	CMM_2561 (*guaB2*)	*inosine-5'-monophosphate dehydrogenase*	I.3	1
17	CMM_2580 (*rplM*)	*50S ribosomal protein L13*	III.3	3
16	CMM_0034	*sugar phosphate isomerase/epimerase*	I.1	1
16	CMM_2793	*putative acyl dehydratase*	V.2	1
16	CMM_1667 (*sseA*)	*thiosulfate sulfurtransferase*	I.2	1
15	CMM_0595 (*hemH*)	*ferrochelatase*	I.5	1
15	CMM_1168 (*atpG*)	*ATP synthase (F-ATPase gamma subunit)*	IV.1	1
15	CMM_1630	*putative Zn-ribbon protein*	IV.3	1
15	CMM_2479 (*cspA2*)	*cold shock protein*	IV.4	1
15	CMM_0002 (*dnaN*)	*DNA polymerase III, beta chain*	III.1	1
15	CMM_1160	*conserved hypothetical protein*	V.2	1
13	CMM_1012 (*rmlC*)	*dTDP-4-dehydrorhamnose 3,5-epimerase*	II.2	1
13	CMM_0990 (*lpdA*)	*dihydrolipoamide dehydrogenase*	I.1	3
13	CMM_1599 (*fclA*)	*GDP-L-fucose synthase*	II.2	3
13	CMM_1180	*conserved hypothetical protein*	V.2	1
13	CMM_2171 (*gltA2*)	*citrate synthase*	I.1	2
13	CMM_1619 (*fabD*)	*malonyl CoA-acyl carrier protein transacylase*	I.4	1
12	CMM_2870	*hypothetical protein*	V.2	1
12	CMM_1318 (*aroA*)	*3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase*	I.2	1
12	CMM_1621 (*aceE*)	*pyruvate dehydrogenase, E1 component*	I.1	1
11	CMM_1997 (*argF*)	*ornithine carbamoyltransferase*	I.2	2
11	CMM_2469 (*serC*)	*phosphoserine aminotransferase*	I.2	2
11	CMM_2244 (*greA*)	*transcription elongation factor*	III.2	1
11	CMM_2242	*involved in mycothiol biosynthesis*	IV.5	1
11	CMM_1946	*oxidoreductase/monooxygenase*	V.1	1
11	CMM_1831 (*glpK*)	*glycerol kinase*	IV.1	1
11	CMM_2272 (*gndA2*)	*6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating*	I.1	3
10	CMM_0758 (*purM*)	*phosphoribosylformylglycinamidine cyclo-ligase*	I.3	1
10	CMM_1933	*arylesterase*	V.1	1
10	CMM_2094 (*alcA*)	*siderophore biosynthesis enzyme/monooxygenase*	I.6	1
10	CMM_0989 (*punA*)	*purine nucleoside phosphorylase*	I.3	3
10	CMM_1670	*oxidoreductase*	V.1	3
10	CMM_0859	*oxidoreductase*	V.1	1
10	CMM_1884	*transcriptional regulator, with FHA domain*	IV.3	1
10	CMM_2521 (*folD*)	*methylenetetrahydrofolate dehydrogenase/ methenyltetrahydrofolate cyclohydrolase*	I.5	2
10	CMM_2790 (*aspC*)	*aspartate aminotransferase*	I.2	1
9	CMM_1396	*thioredoxin*	IV.5	1
9	CMM_2010 (*rpmI*)	*50S ribosomal protein L35*	III.3	1
9	CMM_1553	*putative amidohydrolase*	V.2	1
9	CMM_1443 (*nadE*)	*NH(3)-dependent NAD(+) synthetase*	I.5	1

Fortsetzung Tabelle 21: zytoplasmatisches Proteom von Cmm*382 in M9-Medium.*

9	CMM_2919 (*deoC*)	*deoxyribose-phosphate aldolase*	I.3	1
9	CMM_1643 (*pepA*)	*cytosol aminopeptidase (leucine aminopeptidase)*	I.2	2
9	CMM_1680	*short chain dehydrogenase/oxidoreduxtase*	V.1	1
9	CMM_2544 (*purH*)	*AICAR transformylase/IMP synthetase*	I.3	1
9	CMM_1225	*ATP-dependent RNA helicase*	III.1	1
9	CMM_0965 (*trpS*)	*tryptophanyl-tRNA synthetase*	III.3	1
8	CMM_1828	*dihydroxyacetone kinase*	I.1	1
8	CMM_2062 (*dpsB*)	*DNA-binding ferritin-like protein*	IV.5	1
8	CMM_0388	*alkaline shock protein*	IV.4	1
8	CMM_1953	*conserved hypothetical protein*	V.2	1
8	CMM_2796	*oxidoreductase*	V.1	1
8	CMM_0604 (*pfkA*)	*6-phosphofructokinase*	I.1	1
7	CMM_2936 (*rpmG*)	*50S ribosomal protein L33*	III.3	3
7	CMM_0581	*putative general stress response protein*	IV.4	1
7	CMM_0538 (*upp*)	*uracil phosphoribosyltransferase*	I.3	1
7	CMM_0640	*conserved hypothetical protein*	I.4	1
7	CMM_2011 (*infC*)	*translation initiation factor IF-3*	III.3	1
6	CMM_2485	*sugar ABC transporter, ATPase*	IV.1	1
6	CMM_1551 (*rpsT*)	*30S ribosomal protein S20*	III.3	1
6	CMM_1063	*transcriptional regulator, CarD family*	IV.3	1
6	CMM_0734	*amidohydrolase (CN hydrolase)*	V.1	1
6	CMM_1753	*conserved hypothetical protein*	V.2	1
6	CMM_2935 (*rpsN*)	*30S ribosomal protein S14*	III.3	3
6	CMM_1363 (*ffhA*)	*signal recognition particle protein*	IV.2	1
6	CMM_1356	*conserved hypothetical protein*	V.2	1
5	CMM_0878 (*araA*)	*L-arabinose isomerase*	I.1	1
5	CMM_1656 (*dutA*)	*deoxyuridine 5'-triphosphate pyrophosphatase*	I.3	1
5	CMM_1770 (*hisG*)	*ATP phosphoribosyltransferase*	I.2	1
5	CMM_0153 (*dnaJ1*)	*chaperone, curved DNA-binding protein*	IV.4	1
5	CMM_1783 (*carA*)	*carbamoyl-phosphate synthase, small subunit*	I.3	1
4	CMM_2597 (*adkA*)	*adenylate kinase*	I.3	1
4	CMM_2369	*DNase*	II.2	1
4	CMM_2155	*3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase*	I.4	1
4	CMM_0486	*putative general stress protein*	IV.4	1
4	CMM_1195	*conserved hypothetical protein*	V.2	1
3	CMM_1459 (*rpiA*)	*ribose 5-phosphate isomerase*	I.1	1
3	CMM_2890	*putative phospholipase, alpha/beta hydrolase family*	V.2	1
3	CMM_2060	*cysteine peptidase, family C56*	IV.7	1
3	CMM_0857 (*clpC*)	*ATP-dependent protease, ATPase subunit*	IV.4	1
3	CMM_1250	*hypothetical secreted protein*	V.2	1
3	CMM_2931 (*fecB2*)	*iron-siderophore ABC transporter, SBP*	IV.1	1
3	CMM_2566 (*livK*)	*branched-chain amino acid ABC transporter, SBP*	IV.1	1
2	CMM_2090	*short chain dehydrogenase/oxidoreductase*	V.1	1
2	CMM_2037 (*thyX*)	*alternative thymidylate synthase*	I.3	1
2	CMM_0974 (*manC*)	*mannose-1-phosphate guanylyltransferase*	I.1	1
2	CMM_1157 (*prfA*)	*peptide chain release factor 1 (RF-1)*	III.3	1

Tabelle 22: Mittels MALDI-ToF MS identifizierte zytoplasmatische Proteine aus *Cmm*382 in dem synthetischen Medium XMM. Dargestellt sind alle 335 Proteine, die in einem oder mehreren der Replikate (1, 2, 3 oder 4) bei der Analyse des zytoplasmatischen Proteoms identifiziert wurden. Die entsprechenden Gene wurden nach dem absteigenden *Score*-Wert geordnet. SBP: *substrat-binding protein;* PBP: *penicillin-binding protein*.

Score	**Gen-Name**	**mögliche Funktion**	**COG**	**Replikat-Nr.**
2.155	CMM_2568 (*groES*)	*10 kDa chaperonin (protein Cpn10) (GroES protein)*	IV.4	4
1.614	CMM_2263 (*eno*)	*enolase (2-phosphoglycerate dehydratase)*	I.1	4
1.412	CMM_2478 (*groEL*)	*60 kDa chaperonin (protein Cpn60) (GroEL protein)*	IV.4	4
694	CMM_1675	*hypothetical secreted protein*	V.2	2
660	CMM_2537 (*icdA*)	*isocitrate dehydrogenase*	I.1	4
648	CMM_1744 (*gapA*)	*glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*	I.1	4
603	CMM_2934 (*hupB*)	*DNA-binding protein*	IV.3	3
492	CMM_1736 (*pgiA*)	*glucose-6-phosphate isomerase*	I.1	4
487	CMM_1735 (*talA*)	*transaldolase*	I.1	4

Fortsetzung Tabelle 22: zytoplasmatisches Proteom von Cmm*382 in XMM-Medium.*

430	CMM_2620 (*tuf*)	*elongation factor Tu (EF-Tu)*	III.3	4
419	CMM_2547 (*sucD*)	*succinyl-CoA ligase [ADP-forming], subunit alpha*	I.1	4
416	CMM_1600 (*gmdA*)	*GDP-mannose 4,6-dehydratase*	II.2	4
362	CMM_2316	*putative phosphomutase/lyase*	V.2	4
334	CMM_1831 (*glpK*)	*glycerol kinase*	IV.1	4
330	CMM_2522 (*glyA*)	*serine hydroxymethyltransferase*	I.2	4
321	CMM_0879	*sugar ABC transporter, substrate-binding protein*	IV.1	4
278	CMM_2226 (*fbaA*)	*fructose-bisphosphate aldolase*	I.1	4
272	CMM_2495 (*gpmA*)	*2,3-bisphosphoglycerate-dependent phosphoglycerate mutase (phosphoglyceromutase)*	I.1	4
245	CMM_1852	*cell division initiation protein*	II.1	4
234	CMM_1641 (*aceF*)	*pyruvate/2-oxoglutarate dehydrogenase complex, dihydrolipoamide acyltransferase (E2) component*	I.1	4
229	CMM_0903 (*asdA*)	*aspartate-semialdehyde dehydrogenase*	I.2	2
223	CMM_1757	*response regulator involved in antitermination*	IV.3	3
218	CMM_0866	*alpha-glucoside ABC transporter, SBP*	IV.1	4
212	CMM_0737 (*katA*)	*Catalase*	IV.5	4
199	CMM_1743 (*pgk*)	*phosphoglycerate kinase*	I.1	4
194	CMM_1844	*metallopeptidase, family M20A*	IV.7	4
189	CMM_1636 (*glnA1*)	*glutamine synthetase I*	I.2	4
181	CMM_2548 (*sucC*)	*succinyl-CoA ligase [ADP-forming], subunit beta*	I.1	4
181	CMM_2527	*oxidoreductase*	V.1	4
179	CMM_1166 (*atpH*)	*ATP synthase delta chain*	IV.1	3
167	CMM_2968 (*trxA*)	*thioredoxin reductase*	IV.5	2
167	CMM_1169 (*atpD*)	*ATP synthase, subunit beta(F-ATPase subunit beta)*	IV.1	4
166	CMM_0861 (*rplL*)	*50S ribosomal protein L7/L12*	III.3	4
146	CMM_1619 (*fabD*)	*malonyl CoA-acyl carrier protein transacylase*	I.4	1
142	CMM_0035	*dehydrogenase/oxidoreductase*	V.1	4
136	CMM_1485 (*ndkA*)	*nucleoside diphosphate kinase*	I.3	3
134	CMM_1318 (*aroA*)	*3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase*	I.2	1
133	CMM_2898 (*aldA*)	*L-alanine dehydrogenase*	I.2	4
133	CMM_1458	*conserved hypothetical protein*	V.2	4
132	CMM_0629	*amidinotransferase*	I.2	2
130	CMM_1616 (*fabF*)	*3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase*	I.4	4
129	CMM_1167 (*atpA*)	*ATP Synthase (F-ATPase subunit alpha)*	IV.1	4
128	CMM_2599 (*rplO*)	*50S ribosomal protein L15*	III.3	4
126	CMM_0010 (*ppiA*)	*peptidyl-prolyl cis-trans isomerase*	IV.4	4
126	CMM_2611 (*rpsC*)	*30S ribosomal protein S3*	III.3	2
125	CMM_1848 (*hisD*)	*histidinol dehydrogenase*	I.2	2
123	CMM_1489 (*rplU*)	*50S ribosomal protein L21*	III.3	4
123	CMM_2312 (*moaB*)	*molybdenum cofactor biosynthesis protein*	I.5	1
122	CMM_0151 (*dnaK*)	*chaperone protein dnaK (heat shock protein 70)*	IV.4	4
121	CMM_2604 (*rpsH*)	*30S ribosomal protein S8*	III.3	3
120	CMM_0860 (*rplJ*)	*50S ribosomal protein L10*	III.3	2
119	CMM_1112	*potassium channel protein, beta subunit*	IV.1	4
115	CMM_0034	*sugar phosphate isomerase/epimerase*	I.1	4
106	CMM_2583 (*rplQ*)	*50S ribosomal protein L17*	III.3	4
105	CMM_0989 (*punA*)	*purine nucleoside phosphorylase*	I.3	3
104	CMM_1819	*putatively involved in pyridoxine biosynthesis*	I.5	4
103	CMM_1465 (*clpP2*)	*ATP-dependent Clp protease, proteolytic subunit*	IV.4	3
101	CMM_0841 (*ipyA*)	*inorganic pyrophosphatase*	I.6	4
96	CMM_2006 (*gluB*)	*glutamate ABC transporter, substrate-binding protein*	IV.1	2
95	CMM_1135	*F420-dependent NADP reductase*	V.1	3
95	CMM_1745 (*sodA*)	*superoxide dismutase*	IV.5	4
92	CMM_0921	*endoribonuclease, translation initiation inhibitor*	III.3	4
90	CMM_1461 (*dpsA*)	*stress induced DNA-binding protein*	IV.5	2
89	CMM_2584 (*rpoA*)	*DNA-directed RNA polymerase, subunit alpha*	III.2	4
88	CMM_0731	*conserved hypothetical protein*	V.2	1
87	CMM_0521	*oxidoreductase/dehydrogenase*	V.1	2
86	CMM_0003 (*gndA1*)	*6-phosphogluconate dehydrogenase*	I.1	4
85	CMM_1642 (*lpdB*)	*dihydrolipoyl dehydrogenase*	I.1	4
85	CMM_2446 (*galU*)	*UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase*	I.1	4
85	CMM_2233 (*fumC*)	*fumarate hydratase*	I.1	4
84	CMM_2001 (*argC*)	*N-acetyl-gamma-glutamyl-phosphate reductase*	I.2	2
82	CMM_2617 (*rplC*)	*50S ribosomal protein L3*	III.3	3

Fortsetzung Tabelle 22: zytoplasmatisches Proteom von Cmm*382 in XMM-Medium.*

81	CMM_1104 (*leuB*)	*3-isopropylmalate dehydrogenase*	I.2	3
81	CMM_2579 (*rpsI*)	*30S ribosomal protein S9*	III.3	4
80	CMM_2665	*putative sugar phosphate isomerase/epimerase*	V.2	2
79	CMM_1154 (*thrC*)	*threonine synthase*	I.2	3
78	CMM_1611 (*cspA1*)	*cold shock protein*	IV.4	3
77	CMM_1758 (*pykA*)	*pyruvate kinase*	I.1	4
76	CMM_2060	*cysteine peptidase, family C56*	IV.7	4
74	CMM_1105 (*ilvE*)	*branched-chain amino acid aminotransferase*	I.2	1
73	CMM_2468 (*dtxR*)	*iron-dependent repressor, Dtx family*	IV.3	2
71	CMM_0513 (*pgmA*)	*phosphoglucomutase*	I.1	4
71	CMM_2962 (*ssb*)	*single-stranded DNA-binding protein*	III.1	3
67	CMM_2601 (*rpsE*)	*30S ribosomal protein S5*	III.3	2
67	CMM_2775	*conserved hypothetical protein*	V.2	2
67	CMM_1951	*glycine betaine aldehyde dehydrogenase*	I.1	3
66	CMM_2607 (*rplN*)	*50S ribosomal protein L14*	III.3	3
66	CMM_1020 (*glfA*)	*UDP-galactopyranose mutase*	II.2	4
66	CMM_2773	*putative nitroreductase*	V.2	2
65	CMM_1463 (*tig*)	*trigger factor (TF) (prolyl isomerase; chaperone)*	IV.4	4
65	CMM_2223	*GTP-binding protein, obg family*	III.3	2
65	CMM_2379 (*prpB*)	*methylisocitrate lyase/phosphonomutase*	I.1	1
64	CMM_1988	*putative hydrolase, HAD family*	V.2	2
63	CMM_2185	*peptide ABC transporter, substrate-binding protein*	IV.1	4
62	CMM_1034	*phosphohexomutase*	I.1	4
62	CMM_0932 (*pncA*)	*pyrazinamidase/nicotinamidase*	I.5	2
61	CMM_2603 (*rplF*)	*50S ribosomal protein L6*	III.3	4
60	CMM_1742 (*tpiA*)	*triosephosphate isomerase*	I.1	4
60	CMM_2622 (*rpsG*)	*30S ribosomal protein S7*	III.3	4
60	CMM_2566 (*livK*)	*branched-chain amino acid ABC transporter, SBP*	IV.1	4
59	CMM_0858 (*galE2*)	*UDP-glucose 4-epimerase*	I.1	4
59	CMM_2232 (*cynT*)	*carbonic anhydrase*	I.6	3
56	CMM_1384 (*tsf*)	*elongation factor Ts (EF-Ts)*	III.3	4
54	CMM_0812	*aldehyde dehydrogenase*	V.1	2
53	CMM_2943	*2-keto acid dehydrogenase, E1 beta component*	I.1	2
53	CMM_1367 (*rpsP*)	*30S ribosomal protein S16*	III.3	3
53	CMM_0480	*beta-hydroxyacid dehydrogenase*	V.1	2
52	CMM_1335 (*metX*)	*homoserine O-acetyltransferase*	I.2	2
52	CMM_0873 (*metB*)	*cystathionine gamma-synthase*	I.2	3
52	CMM_0990 (*lpdA*)	*dihydrolipoamide dehydrogenase*	I.1	2
51	CMM_1136	*conserved hypothetical protein*	V.2	3
50	CMM_0640	*conserved hypothetical protein*	I.4	4
50	CMM_2600 (*rpmD*)	*50S ribosomal protein L30*	III.3	3
49	CMM_0594	*putative heme peroxidase*	I.5	3
49	CMM_1526	*oxidoreductase*	V.1	3
49	CMM_2502	*acetyltransferase*	V.1	1
48	CMM_1659 (*acnA*)	*aconitate hydratase*	I.1	4
47	CMM_1567	*hydrolase, HIT family*	V.1	2
46	CMM_1100 (*serA*)	*D-3-phosphoglycerate dehydrogenase*	I.2	2
46	CMM_1670	*oxidoreductase*	V.1	4
46	CMM_0758 (*purM*)	*phosphoribosylformylglycinamidine cyclo-ligase*	I.3	2
45	CMM_1806	*hypothetical protein*	V.2	3
45	CMM_0595 (*hemH*)	*ferrochelatase*	I.5	4
44	CMM_1278	*serine protease, family S1B*	IV.7	2
44	CMM_1828	*dihydroxyacetone kinase*	I.1	2
44	CMM_2035 (*dapA*)	*dihydrodipicolinate synthase*	I.2	3
44	CMM_1738 (*opcA*)	*glucose-6-P dehydrogenase effector*	I.1	3
44	CMM_1772	*peptidyl-prolyl cis-trans isomerase*	IV.4	3
41	CMM_2370 (*metS*)	*methionyl-tRNA synthetase*	III.3	2
40	CMM_0689 (*purA*)	*adenylosuccinate synthetase*	I.3	1
38	CMM_2077 (*aspA*)	*aspartate ammonia-lyase*	I.2	2
38	CMM_2461	*putative translation factor*	III.3	3
37	CMM_2831	*nucleoside-diphosphate-sugar epimerase*	I.1	1
37	CMM_2470	*conserved hypothetical protein*	V.2	2
36	CMM_2783	*sugar ABC transporter, substrate-binding protein*	IV.1	2
36	CMM_1408 (*gatA*)	*glutamyl-tRNA(Gln) amidotransferase, subunit A*	III.3	2
36	CMM_2623 (*rpsL*)	*30S ribosomal protein S12*	III.3	3

Fortsetzung Tabelle 22: zytoplasmatisches Proteom von Cmm*382 in XMM-Medium.*

36	CMM_2605 (*rplE*)	*50S ribosomal protein L5*	III.3	4
36	CMM_2275 (*glmU*)	*UDP-N-acetylglucosamine pyrophosphorylase*	II.2	1
35	CMM_1210	*siderophore-interacting protein*	I.6	2
35	CMM_2047 (*pnp*)	*polyribonucleotide nucleotidyltransferase*	III.3	4
35	CMM_0009	*hypothetical protein*	V.2	3
34	CMM_2610 (*rplP*)	*50S ribosomal protein L16*	III.3	3
33	CMM_0484 (*nagD*)	*N-acetylglucosamine-6-phosphate deacetylase*	I.1	1
33	CMM_1006 (*wcqB*)	*glycosyltransferase, mannosyltransferase*	II.2	1
33	CMM_1856 (*ftsZ*)	*cell division protein*	II.1	2
33	CMM_2469 (*serC*)	*phosphoserine aminotransferase*	I.2	2
32	CMM_2609 (*rpmC*)	*50S ribosomal protein L29*	III.3	3
32	CMM_2664	*conserved hypothetical protein*	V.2	3
32	CMM_0561 (*aspS*)	*aspartyl-tRNA synthetase*	III.3	2
31	CMM_1383 (*rpsB*)	*30S ribosomal protein S2*	III.3	3
31	CMM_0795	*extracellular nuclease/phosphatase*	IV.6	1
31	CMM_0486	*putative general stress protein*	IV.4	1
30	CMM_2787 (*rplK*)	*50S ribosomal protein L11*	III.3	2
30	CMM_1718	*glycosyltransferase*	II.2	3
30	CMM_2270 (*rplY*)	*50S ribosomal protein L25*	III.3	4
29	CMM_2272 (*gndA2*)	*6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating*	I.1	4
29	CMM_2521 (*folD*)	*methylenetetrahydrofolate dehydrogenase/ methenyltetrahydrofolate cyclohydrolase*	I.5	3
29	CMM_2088	*oxidoreductase*	V.1	3
29	CMM_0894	*nucleoside-diphosphate-sugar epimerase*	I.1	4
29	CMM_0538 (*upp*)	*uracil phosphoribosyltransferase*	I.3	2
29	CMM_2485	*sugar ABC transporter, ATPase*	IV.1	4
28	CMM_0196	*sugar ABC transporter, substrate-binding protein*	IV.1	1
28	CMM_2960 (*rplI*)	*50S ribosomal protein L9*	III.3	4
28	CMM_1385 (*pyrH*)	*uridylate kinase*	I.3	3
28	CMM_1323 (*guaB*)	*inosine monophosphate dehydrogenase*	I.3	2
28	CMM_2612 (*rplV*)	*50S ribosomal protein L22*	III.3	4
28	CMM_0609	*aldose-1-epimerase*	I.1	3
28	CMM_2371 (*gltA1*)	*citrate synthase*	I.1	1
28	CMM_1753	*conserved hypothetical protein*	V.2	3
27	CMM_2045	*putative phospholipid-binding protein*	V.2	4
27	CMM_0872 (*cysB*)	*cystathionine beta-synthase*	I.2	3
27	CMM_0968 (*ptsA*)	*phosphoenolpyruvate-protein phosphatase*	IV.1	1
26	CMM_1696	*metallopeptidase, family M20A*	IV.7	4
26	CMM_2790 (*aspC*)	*aspartate aminotransferase*	I.2	4
26	CMM_1997 (*argF*)	*ornithine carbamoyltransferase*	I.2	3
26	CMM_2586 (*rpsM*)	*30S ribosomal protein S13*	III.3	3
26	CMM_1553	*putative amidohydrolase*	V.2	2
25	CMM_1804 (*rpsD*)	*30S ribosomal protein S4*	III.3	4
25	CMM_1777 (*metK*)	*S-adenosylmethionine synthetase*	I.5	4
25	CMM_1407 (*gatC*)	*glutamyl-tRNA(Gln) amidotransferase, subunit C*	III.3	2
25	CMM_2523	*glycosidase*	I.1	2
25	CMM_1657	*conserved hypothetical protein*	V.2	3
24	CMM_2590 (*mtlF*)	*PTS system, mannitol-specific IIA component*	IV.1	1
24	CMM_1630	*putative Zn-ribbon protein*	IV.3	1
24	CMM_2554 (*guaA*)	*GMP synthase*	I.3	2
23	CMM_2616 (*rplD*)	*50S ribosomal protein L4*	III.3	4
22	CMM_0883 (*bglJ*)	*beta-glucosidase*	I.1	4
22	CMM_2274 (*prsA*)	*ribose-phosphate pyrophosphokinase*	I.3	2
22	CMM_2895	*conserved hypothetical protein*	V.2	2
22	CMM_2944	*2-keto acid dehydrogenase, E1 beta component*	I.1	3
22	CMM_1587	*oligopeptide ABC transporter, SBP*	IV.1	2
22	CMM_2062 (*dpsB*)	*DNA-binding ferritin-like protein*	IV.5	4
21	CMM_0933 (*gabD*)	*succinate-semialdehyde dehydrogenase*	I.1	2
21	CMM_2873	*aminotransferase*	I.2	2
21	CMM_1631 (*ppgK1*)	*polyphosphate glucokinase, ROK family*	I.1	3
21	CMM_2014 (*hisA*)	*phosphoribosylformimino-5-aminoimidazole carboxamide riboucleotide isomerase*	I.2	2
21	CMM_1798 (*aroC*)	*chorismate synthase (5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate phospholyase)*	I.2	1

Fortsetzung Tabelle 22: zytoplasmatisches Proteom von Cmm*382 in XMM-Medium.*

21	CMM_0962 (*ribC*)	*riboflavin synthase, alpha chain*	I.5	3
21	CMM_1443 (*nadE*)	*NH(3)-dependent NAD(+) synthetase*	I.5	2
20	CMM_2152 (*proS*)	*prolyl-tRNA synthetase*	III.3	2
20	CMM_2196 (*gcvH*)	*glycine cleavage system, H protein*	I.2	4
20	CMM_1764 (*trpC*)	*indole-3-glycerol phosphate synthase*	I.2	2
20	CMM_1028 (*galE1*)	*UDP-glucose 4-epimerase*	II.2	3
20	CMM_1617 (*acpP*)	*acyl carrier protein*	I.4	1
19	CMM_2602 (*rplR*)	*50S ribosomal protein L18*	III.3	4
19	CMM_0289	*conserved secreted protein*	V.2	1
19	CMM_1654	*conserved hypothetical protein*	V.2	2
19	CMM_1459 (*rpiA*)	*ribose 5-phosphate isomerase*	I.1	1
19	CMM_1829	*dihydroxyacetone kinase*	I.1	3
18	CMM_1998 (*argD*)	*acetylornithine aminotransferase*	I.2	1
18	CMM_1409 (*gatB*)	*aspartyl/glutamyl-tRNA(Asn/Gln) amidotransferase, subunit B*	III.3	3
18	CMM_1466	*monooxygenase*	V.1	1
18	CMM_1356	*conserved hypothetical protein*	V.2	1
18	CMM_2769	*conserved hypothetical protein*	V.2	2
18	CMM_0983 (*addA*)	*adenosine deaminase*	I.3	1
18	CMM_1004 (*purE*)	*phosphoribosylaminoimidazole carboxylase, catalytic subunit*	I.3	1
17	CMM_1096 (*ilvC*)	*ketol-acid reductoisomerase*	I.2	4
17	CMM_2057	*2,5-diketo-D-gluconic acid reductase*	I.1	3
17	CMM_2870	*hypothetical protein*	V.2	2
17	CMM_2615 (*rplW*)	*50S ribosomal protein L23*	III.3	2
17	CMM_1473 (*pckA*)	*phosphoenolpyruvate carboxykinase*	I.1	3
17	CMM_2535 (*sbtB*)	*subtilisin-like extracellular serine protease, peptidase family S8A*	IV.6	1
17	CMM_1876 (*glkA*)	*glucokinase, ROK family, putative catabolite repressor*	I.1	2
16	CMM_1621 (*aceE*)	*pyruvate dehydrogenase, E1 component*	I.1	4
16	CMM_1082	*putative monooxygenase involved in AB biosynthesis*	IV.5	2
16	CMM_0727	*hydrolase*	V.1	2
16	CMM_1094 (*ilvB*)	*acetolactate synthase*	I.2	2
16	CMM_2009 (*rplT*)	*50S ribosomal protein L20*	III.3	3
16	CMM_2606 (*rplX*)	*50S ribosomal protein L24*	III.3	4
16	CMM_0969 (*sdhB*)	*succinate dehydrogenase, iron-sulfur protein*	I.1	2
15	CMM_1783 (*carA*)	*carbamoyl-phosphate synthase, small subunit*	I.3	2
15	CMM_1593	*conserved hypothetical protein*	V.2	1
15	CMM_2900 (*dcd*)	*deoxycytidine triphosphate deaminase*	I.3	2
15	CMM_2614 (*rplB*)	*50S ribosomal protein L2*	III.3	4
14	CMM_2000 (*argJ*)	*glutamate N-acetyltransferase/ornithine acetyltransferase*	I.2	1
14	CMM_2163 (*gabT*)	*4-aminobutyrate aminotransferase*	I.2	3
14	CMM_1933	*arylesterase*	V.1	4
14	CMM_1336 (*metY*)	*O-acetylhomoserine (thiol)-lyase*	I.2	2
14	CMM_0859	*oxidoreductase*	V.1	3
14	CMM_1250	*hypothetical secreted protein*	V.2	2
13	CMM_0366	*nucleoside-diphosphate-sugar epimerase*	I.1	2
13	CMM_0882 (*xylA*)	*xylose isomerase*	I.1	3
13	CMM_1667 (*sseA*)	*thiosulfate sulfurtransferase*	I.2	3
13	CMM_1923 (*ggtA*)	*gamma-glutamyltranspeptidase*	IV.5	2
13	CMM_2479 (*cspA2*)	*cold shock protein*	IV.4	2
13	CMM_1752 (*rpsA*)	*30S ribosomal protein S1*	III.3	3
13	CMM_2137	*sugarkinase, ROK family*	I.1	3
12	CMM_1010 (*rmlB*)	*dTDP-glucose 4,6-dehydratase*	II.2	3
12	CMM_1012 (*rmlC*)	*dTDP-4-dehydrorhamnose 3,5-epimerase*	II.2	1
12	CMM_2538	*acetyltransferase*	V.1	1
12	CMM_0753 (*purC*)	*phosphoribosylaminoimidazole-succinocarboxamide synthase*	I.3	1
12	CMM_2735 (*glpX*)	*fructose-1,6-bisphosphatase*	I.1	1
12	CMM_2475	*two-component system, response regulator*	IV.3	1
11	CMM_2770	*putative sugar phosphate isomerase/epimerase*	I.1	2
11	CMM_2919 (*deoC*)	*deoxyribose-phosphate aldolase*	I.3	1

Fortsetzung Tabelle 22: zytoplasmatisches Proteom von Cmm*382 in XMM-Medium.*

11	CMM_1884	*transcriptional regulator, with FHA domain*	IV.3	2
11	CMM_1643 (*pepA*)	*cytosol aminopeptidase (leucine aminopeptidase)*	I.2	3
11	CMM_2242	*involved in mycothiol biosynthesis*	IV.5	1
11	CMM_2890	*putative phospholipase, alpha/beta hydrolase family*	V.2	2
11	CMM_2110	*sugar alcohol dehydrogenase*	V.1	1
10	CMM_2613 (*rpsS*)	*30S ribosomal protein S19*	III.3	3
10	CMM_1634 (*glnA2*)	*glutamine synthetase II*	I.2	2
10	CMM_1687 (*tatA*)	*Sec-independent twin-arginine protein translocase protein*	IV.2	1
10	CMM_2621 (*fusA*)	*elongation factor G (EF-G)*	III.3	2
10	CMM_2519 (*galK*)	*galactokinase*	I.1	3
10	CMM_2724	*anti-sigma factor antagonist*	IV.3	1
10	CMM_1996 (*argG*)	*argininosuccinate synthase (citrulline-aspartate ligase)*	I.2	2
10	CMM_1258	*conserved hypothetical protein*	V.2	2
10	CMM_0662 (*adhA*)	*NADP-dependent alcohol dehydrogenase*	V.1	4
10	CMM_1396	*thioredoxin*	IV.5	3
10	CMM_0589	*conserved hypothetical protein*	I.5	1
9	CMM_2592	*phosphoenolpyruvate-protein phosphotransferase, PTS enzyme I*	IV.1	1
9	CMM_2369	*DNase*	III.1	2
9	CMM_2915	*Zn-dependent dehydrogenase*	V.1	2
9	CMM_1160	*conserved hypothetical protein*	V.2	2
9	CMM_1737 (*zwfA2*)	*glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase*	I.1	3
9	CMM_2456	*hydantoinase*	I.3	1
9	CMM_2544 (*purH*)	*AICAR transformylase/IMP synthetase*	I.3	1
9	CMM_0876 (*araB*)	*ribulokinase*	I.1	2
8	CMM_0630 (*rocD*)	*ornithine aminotransferase*	I.2	2
8	CMM_0709	*stress-induced protein, putative organic hydroperoxide resistance protein*	IV.5	3
8	CMM_2048 (*rpsO*)	*30S ribosomal protein S15*	III.3	2
8	CMM_0179	*NAD-dependent aldehyde dehydrogenase*	V.1	3
8	CMM_0653 (*cysK*)	*cysteine synthase*	I.2	2
8	CMM_1457 (*pepN*)	*aminopeptidase N*	I.2	2
8	CMM_1514	*conserved hypothetical protein*	V.2	2
8	CMM_1656 (*dutA*)	*deoxyuridine 5'-triphosphate pyrophosphatase*	I.3	1
7	CMM_1716 (*rpmE2*)	*50S ribosomal protein L31, type B*	III.3	1
7	CMM_0991 (*accA*)	*acetyl/propionyl-CoA carboxylase subunit*	I.4	1
7	CMM_1995 (*argH*)	*argininosuccinate lyase*	I.2	3
7	CMM_1093 (*ilvD*)	*dihydroxy-acid dehydratase*	I.2	2
7	CMM_0878 (*araA*)	*L-arabinose isomerase*	I.1	4
7	CMM_2482	*methionine-R-sulfoxide reductase*	IV.5	1
6	CMM_1180	*conserved hypothetical protein*	V.2	3
6	CMM_2171 (*gltA2*)	*citrate synthase*	I.1	3
6	CMM_0685	*antimicrobial peptide ABC transporter, permease component*	IV.1	2
6	CMM_1431 (*treY*)	*maltooligosyltrehalose synthase*	I.1	1
6	CMM_1386 (*frr*)	*ribosome-recycling factor (ribosome-releasing factor)*	III.3	1
6	CMM_1168 (*atpG*)	*ATP synthase (F-ATPase gamma subunit)*	IV.1	2
6	CMM_1371 (*mapA1*)	*methionine aminopeptidase*	III.3	1
6	CMM_2974	*DNA/RNA binding protein*	V.1	2
6	CMM_2963 (*rpsF*)	*30S ribosomal protein S6*	III.3	4
6	CMM_2580 (*rplM*)	*50S ribosomal protein L13*	III.3	1
6	CMM_1430 (*treZ*)	*maltooligosyl trehalose trehalohydrolase*	I.1	1
6	CMM_1490 (*rpmA*)	*50S ribosomal protein L27*	III.3	1
5	CMM_0485 (*cpdA*)	*3',5'-cyclic-nucleotide phosphodiesterase*	IV.3	1
5	CMM_1256	*Zn-dependent alcohol dehydrogenase*	V.1	1
5	CMM_0417	*conserved hypothetical protein*	V.2	1
5	CMM_2597 (*adkA*)	*adenylate kinase*	I.3	1
5	CMM_2608 (*rpsQ*)	*30S ribosomal protein S17*	III.3	1
4	CMM_2796	*oxidoreductase*	V.1	1
4	CMM_0777	*possibly involved in inositol metabolism*	I.1	1
4	CMM_1879	*oxidoreductase (similar to E3 component of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex)*	V.1	3
4	CMM_0385 (*ltaE*)	*L-threonine aldolase*	I.2	1

Fortsetzung Tabelle 22: zytoplasmatisches Proteom von Cmm*382 in XMM-Medium.*

4	CMM_2010	*50S ribosomal protein L35*	III.3	3
4	CMM_1633 (*panB*)	*3-methyl-2-oxobutanoate hydroxymethyltransferase*	I.5	1
4	CMM_0757 (*purF*)	*amidophosphoribosyltransferase*	I.3	1
4	CMM_0757 (*purF*)	*amidophosphoribosyltransferase*	I.3	2
3	CMM_1680	*short chain dehydrogenase/oxidoreduxtase*	V.1	1
3	CMM_0942	*ribokinase*	I.1	1
3	CMM_1106	*putative fumarylacetoacetate hydrolase*	V.2	3
3	CMM_2936 (*rpmG*)	*50S ribosomal protein L33*	III.3	2
3	CMM_2076	*hypothetical protein*	V.2	3
2	CMM_1629	*conserved hypothetical protein*	V.2	1
2	CMM_1319 (*sigH*)	*RNA polymerase sigma factor*	IV.3	1
2	CMM_1698	*nucleoside-diphosphate-sugar epimerase*	I.1	1
2	CMM_2576 (*glmS*)	*glucosamine-fructose-6-phosphate aminotransferase*	I.1	1
2	CMM_1195	*conserved hypothetical protein*	V.2	1
2	CMM_2197 (*gcvT*)	*aminomethyltransferase*	I.2	1
2	CMM_2920	*aminopeptidase, M18 family*	IV.7	1

7.4 Microarray-Daten des Transkriptoms von *Cmm*382

Die Transkriptmengen der Gene von *Cmm*382 wurden in unterschiedlichen Medien bestimmt und verglichen, um mögliche Unterschiede im mRNA-Level feststellen zu können. Verglichen wurden dabei die Transkriptmengen in Minimalmedium M9 und dem synthetischen Medium XMM (Tabelle 23 und Tabelle 24). Die Transkriptmenge von 247 Genen war in XMM-Medium höher als in M9-Medium, die von 179 war niedriger, wobei kaum Virulenzgene identifiziert wurden. Außerdem waren die Transkriptmengen von 237 Genen in XMM-Medium höher als in Vollmedium TBY und die von 167 niedriger (Tabelle 25 und Tabelle 26). Das mRNA-Level von 151 Genen war in M9-Medium höher als in TBY-Medium und das von 432 war niedriger (Tabelle 27 und Tabelle 28). Des Weiteren wurde die Transkriptmenge in XMM-Medium mit der in XMM-Medium + 20 µM der Wundsubstanz Acetosyringon verglichen (Tabelle 29 und Tabelle 30), um die Wirkung von Acetosyringon auf die Genexpression zu testen. Dabei war die Transkriptmenge von 270 Genen in XMM-Medium + 20 µM Acetosyringon höher als in XMM-Medium und die von 198 niedriger. Die Gene im Genom von *Cmm*382 wurden gemäß Flügel und Kollegen in COG-Gruppen eingeteilt (Flügel *et al.*, 2012).

Tabelle 23: Mittels Microarray-Experiment ermittelte Gene, deren Transkriptmengen in XMM-Medium höher waren als in M9-Medium. 247 Gene wurden identifiziert, von denen 164 eine 2- oder mehrfach erhöhte Transkriptmenge zeigten. Die Gene wurden nach dem absteigenden FCA-Wert geordnet. FCA: *fold change absolute*, SBP: *substrate-binding protein.*

FCA	Gen-Name	Mögliche Funktion	COG
34,4	CMM_1473 (*pckA*)	*phosphoenolpyruvate carboxykinase*	I.1
30,9	CMM_0196	*sugar ABC transporter, substrate-binding protein*	IV.1
23,8	CMM_0197	*sugar ABC transporter, permease component*	IV.1
20,0	CMM_2783	*sugar ABC transporter, substrate-binding protein*	IV.1
19,8	CMM_2188	*conserved membrane protein, putative transporter, SSS family*	IV.1
17,9	CMM_2438	*L-arabinose ABC transporter, substrate-binding protein*	IV.1
17,0	CMM_2108	*sugar ABC transporter, permease component*	IV.1
16,4	pCM2_0059	*conserved hypothetical protein*	V.2

Fortsetzung Tabelle 23: Höhere Transkriptmengen in XMM-Medium als in M9-Medium.

14,6	CMM_2107	*sugar ABC transporter, permease component*	IV.1
14,3	CMM_0198	*sugar ABC transporter, permease component*	IV.1
13,3	CMM_0975	*ABC transporter, substrate-binding protein*	IV.1
13,3	CMM_0866	*alpha-glucoside ABC transporter, substrate-binding protein*	IV.1
13,0	CMM_2527	*oxidoreductase*	V.1
11,2	CMM_0521	*oxidoreductase/dehydrogenase*	V.1
10,9	CMM_1314	*iron ABC transporter, substrate-binding protein*	IV.1
10,9	CMM_0086	*sugar ABC transporter, substrate-binding protein*	IV.1
10,6	CMM_1877	*long-chain-fatty-acid-CoA ligase*	I.4
10,5	CMM_1448	*hypothetical protein*	V.2
9,6	CMM_2782	*sugar ABC transporter, permease component*	IV.1
8,8	CMM_2733	*sugar ABC transporter, substrate-binding protein*	IV.1
8,8	CMM_0035	*dehydrogenase/oxidoreductase*	V.1
8,7	CMM_0112	*dehydrogenase/oxidoreductase*	V.1
8,6	CMM_0520	*conserved hypothetical protein*	V.2
8,5	CMM_2843	*sugar ABC transporter, permease component*	IV.1
8,4	pCM2_0060	*conserved hypothetical protein*	V.2
8,3	CMM_2758	*conserved hypothetical protein*	V.2
8,3	pCM1_0001	*hypothetical protein*	V.2
8,0	CMM_0620	*hypothetical protein*	V.2
8,0	CMM_0441	*hypothetical secreted protein*	V.2
7,8	CMM_2731	*sugar ABC transporter, permease component*	IV.1
7,5	CMM_0034	*sugar phosphate isomerase/epimerase*	I.1
7,3	CMM_1662 (*fadA*)	*3-oxoacyl-CoA thiolase*	I.4
7,2	CMM_0865	*transcriptional regulator, LacI family*	IV.3
7,0	CMM_2664	*conserved hypothetical protein*	V.2
6,6	CMM_0619 (*putA*)	*delta-1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase /proline oxidase*	I.2
6,6	CMM_2665	*putative sugar phosphate isomerase/epimerase*	V.2
6,3	CMM_2845	*conserved hypothetical protein, putative monooxygenase*	V.2
6,2	CMM_0678 (*pknC*)	*serine/threonine protein kinase*	IV.3
6,1	CMM_1587	*oligopeptide ABC transporter, substrate-binding protein*	IV.1
6,1	CMM_0922 (*acsA1*)	*acetyl-coenzyme A synthetase*	I.4
6,0	CMM_2730	*sugar ABC transporter, permease component*	IV.1
5,9	CMM_1831 (*glpK*)	*glycerol kinase*	IV.1
5,8	CMM_0451	*conserved hypothetical protein*	V.2
5,8	CMM_0245	*hypothetical secreted protein (sortase-sorted)*	II.2
5,7	CMM_2077 (*aspA*)	*aspartate ammonia-lyase*	I.2
5,7	CMM_2779	*carboxylesterase*	V.1
5,7	CMM_2781	*sugar ABC transporter, permease component*	IV.1
5,6	CMM_0345	*conserved secreted protein*	V.2
5,6	CMM_0442	*hypothetical protein*	V.2
5,5	CMM_2196 (*gcvH*)	*glycine cleavage system, H protein*	I.2
5,5	CMM_0795	*extracellular nuclease/phosphatase*	IV.6
5,4	CMM_0296	*sugar ABC transporter, substrate-binding protein*	IV.1
5,4	CMM_1885 (*dctA*)	*Na+/H+-dicarboxylate symporter, DAACS family*	IV.1
5,3	CMM_0058	*hypothetical protein*	V.2
5,3	CMM_0630 (*rocD*)	*ornithine aminotransferase*	I.2
5,3	CMM_2437	*L-arabinose ABC transporter, permease component*	IV.1
5,3	CMM_0247	*oxidoreductase/dehydrogenase*	V.1
5,3	CMM_1661 (*fadB*)	*enoyl-CoA hydratase / 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase*	I.4
5,1	CMM_0265	*conserved hypothetical protein*	V.2
5,0	CMM_1259	*alpha-mannosidase*	I.1
5,0	CMM_1829	*dihydroxyacetone kinase*	I.1
4,9	CMM_2485	*sugar ABC transporter, ATPase*	IV.1
4,9	CMM_0095 (*cytB*)	*3Fe-4S ferredoxin*	IV.5
4,8	CMM_2197 (*gcvT*)	*aminomethyltransferase*	I.2
4,8	CMM_1474	*transcriptional regulator, Cro/CI family*	IV.3
4,7	CMM_0094 (*cytA*)	*cytochrome P450*	IV.5
4,7	CMM_2279	*conserved membrane protein, LysE transporter family*	IV.1
4,5	CMM_0883 (*bglJ*)	*beta-glucosidase*	I.1
4,3	CMM_0976	*ABC transporter, substrate-binding protein*	IV.1
4,3	CMM_2424	*hypothetical protein*	V.2
4,1	CMM_1557	*hypothetical secreted protein*	V.2
4,0	CMM_2435 (*abfA2*)	*alpha-L-arabinofuranosidase*	I.1

Fortsetzung Tabelle 23: Höhere Transkriptmengen in XMM-Medium als in M9-Medium.

4,0	CMM_2436	*L-arabinose ABC transporter, permease component*	IV.1
4,0	CMM_2187	*conserved membrane protein*	V.2
4,0	CMM_1447	*hypothetical protein*	V.2
3,9	CMM_2844	*sugar ABC transporter, ATPase*	IV.1
3,9	CMM_1674 (*xysB*)	*endo-1,4-beta-xylanase B*	IV.6
3,9	CMM_0629	*amidinotransferase*	I.2
3,8	CMM_1102	*efflux MFS permease*	IV.1
3,8	CMM_2562 (*livH*)	*branched-chain amino acid ABC transporter, permease protein*	IV.1
3,8	CMM_0490	*membrane protein*	V.2
3,8	CMM_0972 (*sdhC*)	*succinate dehydrogenase, cytochrome b subunit*	I.1
3,7	CMM_1827	*PTS system hybrid protein*	IV.1
3,6	CMM_0858 (*galE2*)	*UDP-glucose 4-epimerase*	I.1
3,6	CMM_0859	*oxidoreductase*	V.1
3,6	CMM_1823 (*glpD*)	*glycerol-3-phosphate dehydrogenase*	I.1
3,6	CMM_2195 (*gcvP*)	*glycine dehydrogenase [decarboxylating]*	I.2
3,5	CMM_0971 (*sdhD*)	*succinate dehydrogenase, hydrophobic membrane subunit*	I.1
3,5	CMM_2106	*sugar ABC transporter, substrate-binding protein*	IV.1
3,5	CMM_1830 (*glpF*)	*glycerol uptake facilitator protein, MIP family*	IV.1
3,4	CMM_2923	*hypothetical membrane protein*	V.2
3,4	CMM_0360	*sugar ABC transporter, permease component*	IV.1
3,4	CMM_0684	*antimicrobial peptide ABC transporter, ATPase*	IV.1
3,4	CMM_0685	*antimicrobial peptide ABC transporter, permease component*	IV.1
3,3	CMM_0272	*sugar ABC transporter, permease component*	IV.1
3,3	CMM_2534	*ABC transporter ATPase*	IV.1
3,2	CMM_2060	*cysteine peptidase, family C56*	IV.7
3,2	CMM_0074	*conserved hypothetical protein*	V.2
3,2	CMM_2425	*conserved membrane protein*	V.2
3,1	CMM_0109	*sugar ABC transporter, substrate-binding protein*	IV.1
3,1	CMM_1312	*iron ABC transporter, permease component*	IV.1
3,1	CMM_0813	*acyl-CoA oxidase*	I.4
3,0	CMM_0970	*succinate dehydrogenase flavoprotein subunit*	I.1
2,9	CMM_0403 (*glpT*)	*glycerol-3-phosphate MFS permease*	IV.1
2,9	CMM_2592	*phosphoenolpyruvate-protein phosphotransferase, PTS enzyme I*	IV.1
2,9	CMM_1075	*hypothetical protein*	V.2
2,9	CMM_0450	*oxidoreductase*	V.1
2,9	CMM_2006 (*gluB*)	*glutamate ABC transporter, substrate-binding protein*	IV.1
2,8	CMM_0201	*glycosyl hydrolase, family 2*	I.1
2,8	CMM_1719 (*glgC*)	*glucose-1-phosphate adenylyltransferase*	I.1
2,8	CMM_1872	*conserved secreted protein, peptidoglycan-binding*	V.2
2,8	CMM_2235	*ATPase/ribonuclease*	V.1
2,8	CMM_0680	*acyl-CoA ligase/aldehyde dehydrogenase*	V.1
2,8	CMM_0469	*oxidoreductase*	V.1
2,8	CMM_2007 (*gluA*)	*glutamate ABC transporter, ATPase*	IV.1
2,7	CMM_1828	*dihydroxyacetone kinase*	I.1
2,7	CMM_0417	*conserved hypothetical protein*	V.2
2,7	CMM_2547 (*sucD*)	*succinyl-CoA ligase [ADP-forming], subunit alpha*	I.1
2,7	CMM_0362	*alpha glucosidase*	I.1
2,7	CMM_1933	*arylesterase*	V.1
2,6	CMM_2535 (*sbtB*)	*subtilisin-like extracellular serine protease, peptidase family S8A*	IV.6
2,6	CMM_0884	*acetyltransferase*	V.1
2,6	CMM_1659 (*acnA*)	*aconitate hydratase*	I.1
2,5	CMM_0681 (*fabB*)	*3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase*	I.4
2,5	CMM_1101	*transcriptional regulator, TetR family*	IV.3
2,5	CMM_0627	*putative cell-wall associated protein*	II.2
2,5	CMM_0945	*sugar ABC transporter, permease component*	IV.1
2,5	CMM_1435	*ABC transporter, ATPase*	IV.1
2,5	CMM_0683 (*coaBC*)	*pantothenate metabolism flavoprotein*	I.5
2,4	CMM_0040	*hypothetical protein*	V.2
2,4	CMM_2418 (*fadD*)	*long-chain-fatty-acid-CoA ligase*	I.4
2,4	CMM_2780	*sugar hydrolase*	V.1
2,4	CMM_0661	*conserved hypothetical protein, putative NTPase*	V.2
2,4	CMM_0105 (*ramA*)	*alpha-rhamnosidase*	I.1
2,4	CMM_2533	*ABC-transporter, permease component*	IV.1

Fortsetzung Tabelle 23: Höhere Transkriptmengen in XMM-Medium als in M9-Medium.

2,3	CMM_1071	*hypothetical protein*	V.2
2,3	CMM_0240	*short chain alcohol dehydrogenase*	V.1
2,3	CMM_0195	*hypothetical protein*	V.2
2,3	CMM_2901	*hypothetical protein*	V.2
2,3	CMM_0096 (*cytC*)	*ferredoxin reductase*	IV.5
2,3	CMM_0522	*hypothetical protein*	V.2
2,2	CMM_1313	*iron ABC transporter, ATPase*	IV.1
2,2	CMM_2110	*sugar alcohol dehydrogenase*	V.1
2,2	CMM_0663	*carboxylesterase, type B*	V.1
2,2	pCM2_0067	*hypothetical protein*	V.2
2,2	CMM_0969 (*sdhB*)	*succinate dehydrogenase, iron-sulfur protein*	I.1
2,2	CMM_2379 (*prpB*)	*methylisocitrate lyase/phosphonomutase*	I.1
2,1	CMM_0321	*oxidoreductase*	V.1
2,1	CMM_2213	*conserved hypothetical protein, universal stress protein*	IV.4
2,1	CMM_2116 (*thiED*)	*thiamine-phosphate synthase/phosphomethylpyrimidine kinase*	I.5
2,1	CMM_2689	*hypothetical protein*	V.2
2,1	CMM_2668	*conserved membrane protein*	V.2
2,1	CMM_2548 (*sucC*)	*succinyl-CoA ligase [ADP-forming], subunit beta*	I.1
2,1	CMM_0297	*sugar ABC transporter, permease component*	IV.1
2,1	CMM_0951	*membrane protein*	V.2
2,1	CMM_1532 (*proX*)	*proline/glycine/betaine/choline ABC transporter, SBP*	IV.1
2,1	CMM_0246	*hypothetical protein*	V.2
2,1	CMM_1753	*conserved hypothetical protein*	V.2
2,0	CMM_2036	*hypothetical secreted protein*	V.2
2,0	CMM_2226 (*fbaA*)	*fructose-bisphosphate aldolase*	I.1
2,0	CMM_2171 (*gltA2*)	*citrate synthase*	I.1
2,0	CMM_1504 (*fruA*)	*phosphoenolpyruvate-dependent fructose phosphotransferase system, EIIA, EIIB, EIIC*	IV.1
2,0	CMM_2059	*hypothetical secreted protein*	V.2
2,0	CMM_1266	*Zn-metalloprotease*	IV.7
2,0	CMM_2255	*anti-sigma factor antagonist*	IV.3
2,0	CMM_2081	*Mn2+/Fe2+ transport protein, NRAMP family*	IV.1
1,9	CMM_0486	*conserved hypothetical protein, putative general stress protein*	IV.4
1,9	CMM_1306	*secreted protein*	IV.2
1,9	CMM_0132	*conserved secreted protein*	V.2
1,9	CMM_1745 (*sodA*)	*superoxide dismutase*	IV.5
1,9	CMM_1026 (*gcdH*)	*glutaryl-CoA dehydrogenase*	II.2
1,9	CMM_2537 (*icdA*)	*isocitrate dehydrogenase*	I.1
1,9	CMM_0653 (*cysK*)	*cysteine synthase*	I.2
1,9	CMM_1533	*hypothetical protein*	V.2
1,9	CMM_1720 (*serB2*)	*phosphoserine phosphatase*	I.2
1,9	CMM_0421	*sugar ABC transporter, permease component*	IV.1
1,8	CMM_2254	*anti-sigma regulatory factor (Ser/Thr protein kinase)*	IV.3
1,8	CMM_2057	*2,5-diketo-D-gluconic acid reductase*	I.1
1,8	CMM_2344 (*modA*)	*molybdate ABC transporter, substrate-binding protein*	IV.1
1,8	CMM_0974 (*manC*)	*mannose-1-phosphate guanylyltransferase*	I.1
1,8	CMM_0407	*hydrolase, alpha/beta hydrolase fold family*	V.1
1,7	CMM_0422	*sugar ABC transporter, ATPase*	IV.1
1,7	CMM_PS_22	CMM_PS_22	V.2
1,7	CMM_1133 (*echA*)	*enoyl-CoA hydratase*	I.4
1,7	CMM_2955	*glycosyltransferase*	II.2
1,7	CMM_0476	*hypothetical protein*	V.2
1,7	CMM_0910	*conserved secreted protein*	V.2
1,7	CMM_1084	*conserved hypothetical protein, putative sugar kinase*	I.1
1,7	CMM_0359	*sugar ABC transporter, substrate-binding protein*	IV.1
1,7	CMM_2345	*transcriptional regulator involved in molybdate uptake*	IV.3
1,7	CMM_0679	*acetyltransferase*	V.1
1,7	CMM_0513 (*pgmA*)	*phosphoglucomutase*	I.1
1,6	CMM_2410	*sugar ABC transporter, substrate-binding protein*	IV.1
1,6	CMM_0986	*membrane protein*	V.2
1,6	CMM_0682 (*ilvG*)	*acetolacetate synthase*	I.2
1,6	CMM_0899	*conserved membrane protein*	V.2
1,6	CMM_2112	*conserved hypothetical protein, putative phosphotransferase*	V.2
1,6	CMM_0226	*hypothetical secreted protein*	V.2

Fortsetzung Tabelle 23: Höhere Transkriptmengen in XMM-Medium als in M9-Medium.

1,6	CMM_1180	*conserved hypothetical protein*	V.2
1,6	CMM_0962 (*ribC*)	*riboflavin synthase, alpha chain*	I.5
1,6	CMM_1048	*conserved membrane protein*	V.2
1,6	CMM_1434	*ABC transporter, permease component*	IV.1
1,6	CMM_0792	*sugar ABC transporter, substrate-binding protein*	IV.1
1,5	CMM_0987	*transcriptional regulator, MerR family*	IV.3
1,5	CMM_2316	*conserved hypothetical protein, putative phosphomutase/lyase*	V.2
1,5	CMM_1421	*conserved hypothetical protein, putative phosphoesterase*	V.2
1,5	CMM_0938	*multidrug export ABC transporter, ATPase*	IV.1
1,5	CMM_2216	*hypothetical protein*	V.2
1,5	CMM_0950	*conserved hypothetical protein*	V.2
1,5	CMM_0939	*multidrug export ABC transporter, permease component*	IV.1
1,5	CMM_2924	*hypothetical membrane protein*	V.2
1,5	CMM_2183	*peptide ABC transporter, permease component*	IV.1
1,5	CMM_2212	*amino acid permease, APC family*	IV.1
1,4	CMM_0288	*oxidoreductase*	V.1
1,4	CMM_1425	*conserved hypothetical protein*	V.2
1,4	CMM_2323	*hypothetical membrane protein*	V.2
1,4	CMM_1444	*hypothetical protein*	V.2
1,4	CMM_0305	*acetyltransferase*	V.1
1,4	CMM_1718	*glycosyltransferase*	II.2
1,4	CMM_0547	*transcriptional regulator, ArsR family*	IV.3
1,4	CMM_1258	*conserved hypothetical protein*	V.2
1,4	CMM_1866	*conserved hypothetical protein*	V.2
1,4	CMM_0677 (*sbcD*)	*dsDNA exonuclease subunit*	III.1
1,4	CMM_0850	*conserved membrane protein*	V.2
1,4	CMM_0254	*conserved hypothetical protein*	V.2
1,4	CMM_2469 (*serC*)	*phosphoserine aminotransferase*	I.2
1,4	CMM_0591	*hypothetical protein*	I.5
1,4	CMM_0946	*sugar ABC transporter, permease component*	IV.1
1,4	CMM_2111	*glutaredoxin*	IV.5
1,4	CMM_2661	*hypothetical membrane protein*	V.2
1,4	CMM_0666	*flavin-dependent reductase*	I.1
1,3	CMM_1562	*conserved hypothetical protein*	V.2
1,3	CMM_0426	*manganese-containing catalase*	IV.5
1,3	CMM_2617 (*rplC*)	*50S ribosomal protein L3*	III.3
1,3	CMM_2339	*hypothetical membrane protein*	V.2
1,3	CMM_1116	*conserved membrane protein, TerC family*	IV.1
1,3	CMM_1331	*two-component system, response regulator*	IV.3
1,2	CMM_0399	*conserved hypothetical protein*	V.2
1,2	CMM_2790 (*aspC*)	*aspartate aminotransferase*	I.2
1,2	CMM_2397	*hypothetical protein*	V.2
1,2	CMM_1990 (*tyrS*)	*tyrosyl-tRNA synthetase*	III.3
1,2	CMM_1963 (*clvG*)	*conserved membrane protein, putative ABC transporter, permease component*	IV.1
1,2	CMM_0989 (*punA*)	*purine nucleoside phosphorylase*	I.3
1,1	CMM_2055 (*aptA*)	*adenine phosphoribosyltransferase*	I.3
1,1	CMM_2855	*conserved membrane protein, putative multidrug exporter, MOP(MATE) family*	IV.1
1,1	CMM_0741	*conserved membrane protein*	IV.1
1,1	CMM_2301	*hypothetical protein*	V.2

Tabelle 24: Mittels Microarray-Experiment ermittelte *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*-Gene, deren mRNA-Level in XMM-Medium niedriger war als in M9-Medium. 179 Gene wurden identifiziert, von denen 31 eine 2- oder mehrfach höhere Transkriptmenge zeigten. Die Gene wurden nach dem absteigenden FCA-Wert geordnet. FCA: *fold change absolute*.

FCA	Gen-Name	Mögliche Funktion	COG
6,8	CMM_2931 (*fecB2*)	*iron-siderophore ABC transporter, substrate-binding protein*	IV.1
4,2	CMM_2729	*conserved hypothetical protein (sortase-sorted)*	II.2
3,9	CMM_1129	*siderophore-interacting protein*	I.6
3,5	CMM_1759 (*gltD*)	*glutamate synthase (NADPH), beta subunit*	I.2.2

Fortsetzung Tabelle 24: Niedrigere Transkriptmengen in XMM-Medium als in M9-Medium.

3,2	CMM_1699 (*dnaJ3*)	*curved DNA binding protein*	IV.4
3,1	CMM_1726	*ABC transporter ATPase*	IV.1
3,1	CMM_0144	*conserved secreted protein*	V.2
2,9	CMM_0328	*oxidoreductase/methylase*	I.6
2,8	CMM_0152 (*grpE*)	*heat shock chaperone*	IV.4
2,5	CMM_2364	*conserved membrane protein*	V.2
2,4	CMM_2304	*hypothetical protein*	V.2
2,4	CMM_0153 (*dnaJ1*)	*chaperone, curved DNA-binding protein*	IV.4
2,3	CMM_1348	*conserved secreted protein*	V.2
2,3	CMM_1486	*conserved membrane protein*	V.2
2,3	CMM_2933	*conserved membrane protein, putative copper export protein*	IV.1
2,2	CMM_0433 (*fepG*)	*iron-siderophore ABC transporter, permease component*	IV.1
2,2	CMM_1178 (*dapE*)	*succinyl-diaminopimelate desuccinylase*	I.2
2,2	CMM_0014 (*pabA*)	*para-aminobenzoate synthetase, component II*	I.5
2,2	CMM_0154 (*hspR*)	*heat shock regulator, transcriptional regulator, MerR family*	IV.3
2,2	CMM_2951	*hypothetical membrane protein*	V.2
2,1	CMM_1758 (*pykA*)	*pyruvate kinase*	I.1
2,1	CMM_1713	*hydrolase*	V.1
2,1	CMM_1297 (*czcD*)	*cobalt-zinc-cadmium efflux permease, CDF family*	IV.1
2,1	CMM_2577 (*coaA*)	*pantothenate kinase*	I.5
2,1	CMM_2174	*possibly involved in mycothiol synthesis*	IV.5
2,1	CMM_0874 (*rnhA*)	*ribonuclease H*	III.2
2,1	CMM_1507	*ATP-dependent helicase*	III.1
2,1	CMM_2027	*transcriptional regulator, Cro/CI family*	IV.3
2,0	CMM_1954	*conserved hypothetical protein*	V.2
2,0	CMM_2530	*putative hydrolase, HAD family*	V.2
2,0	CMM_1200 (*uvrD3*)	*ATP-dependent DNA helicase*	III.1
2,0	CMM_1953	*conserved hypothetical protein*	V.2
2,0	CMM_2270 (*rplY*)	*50S ribosomal protein L25*	III.3
1,9	CMM_2938 (*furB*)	*ferric uptake regulator, Fur family*	IV.3
1,9	CMM_2381	*duplicated acetyltransferase*	V.1
1,9	CMM_0587 (*hemE*)	*uroporphyrinogen decarboxylase*	I.5
1,9	CMM_1309 (*ftsE*)	*ABC transporter, ATPase involved in cell division*	IV.1
1,9	CMM_2734	*conserved secreted protein, putative esterase/lipase, alpha/beta hydrolase family*	V.2
1,9	CMM_1356	*conserved hypothetical protein*	V.2
1,9	CMM_0710 (*tyrA*)	*chorismate mutase*	I.2
1,9	CMM_1594	*hypothetical protein*	V.2
1,9	CMM_0665 (*fdxA*)	*ferredoxin*	I.1
1,9	CMM_1555 (*lepA*)	*GTP-binding protein*	III.3
1,9	CMM_2561 (*guaB2*)	*inosine-5'-monophosphate dehydrogenase*	I.3
1,9	CMM_2551 (*uvrD1*)	*ATP-dependent DNA helicase*	III.1
1,9	CMM_1955	*conserved hypothetical protein*	V.2
1,9	CMM_1723	*conserved hypothetical protein*	V.2
1,9	CMM_2605 (rplE)	*50S ribosomal protein L5*	III.3
1,9	CMM_2604 (*prsH*)	*30S ribosomal protein S8*	III.3
1,8	CMM_2160 (*dxrA*)	*1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase*	I.1
1,8	CMM_0004 (*recF*)	*DNA replication and repair protein*	III.1
1,8	CMM_0251	*transcriptional regulator, LacI family*	IV.3
1,8	CMM_1500	*hypothetical secreted protein*	V.2
1,8	CMM_0087	*transcriptional regulator, TetR family*	IV.3
1,8	CMM_0209	*hypothetical membrane protein*	V.2
1,8	CMM_0332	*organic acid CoA ligase*	I.6
1,8	CMM_2428 (*nrdB*)	*ribonucleoside-diphosphate reductase, beta subunit*	I.3
1,8	CMM_2052 (*lspA*)	*ATP-dependent DNA helicase*	III.1
1,8	CMM_1900	*conserved membrane protein*	V.2
1,8	CMM_2645	*transcriptional regulator, TetR family*	IV.3
1,7	CMM_1492 (*proB*)	*glutamate 5-kinase*	I.2
1,7	CMM_1724	*conserved hypothetical protein*	V.2
1,7	CMM_0514 (*pheA*)	*prephenate dehydratase*	I.2
1,7	CMM_2123	*hypothetical membrane protein*	V.2
1,7	CMM_1771 (*hisE*)	*phosphoribosyl-ATP pyrophosphatase*	I.2
1,7	CMM_1307	*MFS permease*	IV.1
1,7	CMM_2391	*methyltransferase*	V.1

Fortsetzung Tabelle 24: Niedrigere Transkriptmengen in XMM-Medium als in M9-Medium.

1,7	CMM_1551 (*rpsT*)	*30S ribosomal protein S20*	III.3
1,7	CMM_1729	*2Fe-2S ferredoxin*	IV.5
1,7	CMM_0452	*acetyltransferase*	V.1
1,7	CMM_1161 (*rfeA*)	*undecaprenyl phosphate alpha-N-acetylglucosaminyl-transferase*	II.2
1,7	CMM_2013	*conserved hypothetical protein*	V.2
1,7	CMM_1564 (*hrcA*)	*heat-inducible transcriptional repressor*	IV.3
1,7	CMM_1770 (*hisG*)	*ATP phosphoribosyltransferase*	I.2
1,7	CMM_PS_03	CMM_PS_03	V.2
1,6	CMM_1656 (*dutA*)	*deoxyuridine 5'-triphosphate pyrophosphatase*	I.3
1,6	CMM_2180	*peptide ABC transporter, substrate-binding protein*	IV.1
1,6	CMM_2630 (*rpoC*)	*DNA-directed RNA polymerase, subunit beta*	III.2
1,6	CMM_0503	*transcriptional regulator, TetR family*	IV.3
1,6	CMM_2341	*hypothetical membrane protein*	V.2
1,6	CMM_1221	*hypothetical membrane protein*	V.2
1,6	CMM_0379 (*phnH*)	*C-P (carbon-phosphorus) lyase component*	I.6
1,6	CMM_0806	*transcriptional regulator, GntR family*	IV.3
1,6	CMM_1833 (*trpD*)	*anthranilate phosphoribosyltransferase*	I.2
1,6	CMM_2567	*permease, DMT family*	IV.1
1,6	CMM_0607	*DNA repair protein*	III.1
1,6	CMM_2606 (*rplX*)	*50S ribosomal protein L24*	III.3
1,6	CMM_1847	*transcriptional repressor*	IV.3
1,6	CMM_1813	*preprotein translocase subunit*	IV.2
1,6	CMM_1870	*geranylgeranyl pyrophosphate synthase*	I.6
1,6	CMM_2429 (*nrdA*)	*ribonucleoside-diphosphate reductase*	I.3
1,6	CMM_2026	*conserved hypothetical protein*	V.2
1,6	CMM_1586 (*dnaG*)	*DNA primase*	III.1
1,6	CMM_1495 (*nadD*)	*nicotinate-nucleotide adenylyltransferase*	I.5
1,6	CMM_1624	*transcriptional regulator, TetR family*	IV.3
1,6	CMM_1704	*DNA or RNA helicase*	III.1
1,6	CMM_1150 (*argS*)	*arginyl-tRNA synthetase*	III.3
1,6	CMM_1637	*conserved membrane protein*	V.2
1,6	CMM_2144 (*truB*)	*tRNA pseudouridine synthase B*	III.3
1,6	CMM_0842	*cell cycle protein*	II.1
1,6	CMM_1017 (*wcqG*)	*membrane protein*	II.2
1,5	CMM_1391	*ATP/GTP-binding protein*	V.1
1,5	CMM_1725	*conserved membrane protein*	V.2
1,5	CMM_1310 (*ftsX*)	*ABC transporter, permease component, involved in cell division*	IV.1
1,5	CMM_2853	*transcriptional regulator, MarR family*	IV.3
1,5	CMM_2574 (*alrA1*)	*alanine racemase*	II.2
1,5	CMM_0918	*secreted phosphohydrolase*	IV.6
1,5	CMM_1693	*conserved hypothetical protein*	V.2
1,5	CMM_2142	*membrane protein*	V.2
1,5	CMM_0119	*transcriptional regulator, TetR family*	IV.3
1,5	CMM_0805 (*pepP1*)	*Xaa-Pro aminopeptidase*	I.2
1,5	CMM_2571	*acetyltransferase/glycoprotease fusion protein*	V.1
1,5	CMM_1746 (*whiA*)	*conserved hypothetical protein*	IV.3
1,5	CMM_1767 (*trpE1*)	*anthranilate synthase, component I*	I.2
1,5	CMM_2367 (*ispE*)	*4-diphosphocytidyl-2-C-methyl-D-erythritol kinase*	I.4
1,5	CMM_0601 (*hemO*)	*heme oxygenase (decyclizing)*	I.5
1,5	CMM_2448	*conserved hypothetical protein, putative regulatory protein*	V.2
1,5	CMM_2573 (*alrA2*)	*alanine racemase*	II.2
1,5	CMM_1972	*hypothetical membrane protein*	V.2
1,5	CMM_2799 (*suhB*)	*inositol-1-monophosphatase*	I.1
1,5	CMM_0005	*conserved hypothetical protein*	V.2
1,4	CMM_1157 (*prfA*)	*peptide chain release factor 1 (RF-1)*	III.3
1,4	CMM_1362 (*ftsY*)	*signal recognition particle component*	IV.2
1,4	CMM_2621 (*fusA*)	*elongation factor G (EF-G)*	III.3
1,4	CMM_1766	*tryptophan-associated transmembrane protein*	I.2
1,4	CMM_0237	*hypothetical protein*	V.2
1,4	CMM_2078	*conserved hypothetical protein, putative nuclease*	V.2
1,4	CMM_2786 (*rplA*)	*50S ribosomal protein L1*	III.3
1,4	CMM_1629	*conserved hypothetical protein*	V.2
1,4	CMM_1709	*rRNA methylase*	III.3

Fortsetzung Tabelle 24: Niedrigere Transkriptmengen in XMM-Medium als in M9-Medium.

1,4	CMM_0857 (*clpC*)	*ATP-dependent protease, ATPase subunit*	IV.4
1,4	CMM_1162	*putative AtpI subunit of ATP synthase*	IV.1
1,4	CMM_2143	*membrane protein*	V.2
1,4	CMM_2646	*conserved hypothetical protein*	V.2
1,4	CMM_0372 (*phnN*)	*involved in phosphonate metabolism*	I.6
1,4	CMM_0855	*hypothetical protein*	V.2
1,4	CMM_1795	*short chain dehydrogenase/reductase*	I.2
1,4	CMM_0816	*esterase, lysophospholipase*	V.1
1,4	CMM_1728	*ABC transporter, ATPase*	IV.1
1,4	CMM_1427 (*dinB*)	*DNA polymerase IV*	III.1
1,4	CMM_2058	*lipoprotein signal peptidase*	IV.2
1,4	CMM_2576 (*glmS*)	*glucosamine-fructose-6-phosphate aminotransferase*	I.1
1,4	CMM_1999 (*argB*)	*acetylglutamate kinase (N-acetyl-L-glutamate 5-phosphotransferase)*	I.2
1,4	CMM_1160	*conserved hypothetical protein*	V.2
1,4	CMM_0659 (*addB*)	*adenosine deaminase*	I.3
1,4	CMM_1998 (*argD*)	*acetylornithine aminotransferase*	I.2
1,3	CMM_2090	*short chain dehydrogenase/oxidoreductase*	V.1
1,3	CMM_0214	*conserved hypothetical protein*	V.2
1,3	CMM_2151 (*nusA*)	*transcriptional termination/antitermination factor*	III.2
1,3	CMM_2414	*5-dehydro-4-deoxyglucarate dehydratase*	I.1
1,3	CMM_1298	*conserved membrane protein*	V.2
1,3	CMM_2363 (*moeB*)	*molybdenum cofactor biosynthesis protein*	I.5
1,3	CMM_0588 (h*emY*)	*protoporphyrinogen oxidase*	I.5
1,3	CMM_0856	*conserved hypothetical protein*	V.2
1,3	CMM_1815 (ruvA)	*holliday junction ATP-dependent DNA helicase*	III.1
1,3	CMM_0391	*hypothetical secreted protein*	V.2
1,3	CMM_1197 (*uvrD2*)	*ATP-dependent DNA helicase*	III.1
1,3	CMM_2146	*hypothetical protein*	V.2
1,3	CMM_1772	*peptidyl-prolyl cis-trans isomerase*	IV.4
1,3	CMM_2080	*membrane protein*	V.2
1,3	CMM_1170 (*atpC*)	*ATP synthase, epsilon chain*	IV.1
1,3	CMM_1640 (*pknD*)	*serine/threonine protein kinase*	IV.3
1,3	CMM_2276	*transcriptional regulator, MarR family*	IV.3
1,3	CMM_0016 (*pknA*)	*serine/threonine protein kinase*	IV.3
1,3	CMM_2336	*glycosyltransferase*	II.2
1,3	CMM_1796 (*aroB*)	*3-dehydroquinate synthase*	I.2
1,3	CMM_2243	*conserved hypothetical protein*	V.2
1,3	CMM_0488 (recQ2)	*ATP-dependent DNA helicase*	III.1
1,3	CMM_0688	*conserved hypothetical protein*	V.2
1,2	CMM_0158	*membrane protein*	V.2
1,2	CMM_2241	*conserved membrane protein*	V.2
1,2	CMM_0756	*conserved membrane protein*	V.2
1,2	CMM_1769 (*hisF*)	*imidazole glycerol phosphate synthase, subunit hisF*	I.2
1,2	CMM_1654	*conserved hypothetical protein*	V.2
1,2	CMM_2677	*transcriptional regulator, TetR family*	IV.3
1,2	CMM_0561 (*aspS*)	*aspartyl-tRNA synthetase*	III.3
1,2	CMM_2008	*rRNA methyltransferase*	III.3
1,2	CMM_1797 (*aroK*)	*shikimate kinase*	I.2
1,1	CMM_2756	*esterase/lipase*	V.1

Tabelle 25: Mittels Microarray-Experiment ermittelte *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*-Gene, deren Transkriptmengen in XMM-Medium im Vergleich mit TBY-Medium erhöht waren. 237 Gene wurden identifiziert, von denen 157 eine 2- oder mehrfach erhöhte Transkriptmenge zeigten. Die Gene wurden nach dem absteigenden FCA-Wert geordnet. FCA: *fold change absolute*, SBP: *substrate-binding protein*.

FCA	Gen-Name	Mögliche Funktion	COG
42,7	CMM_1473 (*pckA*)	*phosphoenolpyruvate carboxykinase*	I.1
34,0	CMM_1973	*acyl-CoA dehydrogenase*	V.1
30,7	CMM_1790	*anion ABC transporter, substrate-binding protein*	IV.1
24,9	CMM_0196	*sugar ABC transporter, substrate-binding protein*	IV.1
23,2	pCM1_0006	*hypothetical protein*	IV.2

Fortsetzung Tabelle 25: Höhere Transkriptmengen in XMM-Medium als in TBY-Medium.

22,8	CMM_2054 (*metE2*)	*5-methyltetrahydropteroyltriglutamate-homocysteine methyltransferase*	I.2
19,1	CMM_0197	*sugar ABC transporter, permease component*	IV.1
14,9	CMM_2188	*conserved membrane protein, putative transporter*	IV.1
14,2	CMM_2252	*conserved secreted protein*	V.2
14,0	CMM_0198	*sugar ABC transporter, permease component*	IV.1
12,7	CMM_1789	*anion ABC transporter, permease component*	IV.1
12,5	CMM_0183	*aminotransferase*	I.2
11,7	CMM_2733	*sugar ABC transporter, substrate-binding protein*	IV.1
10,9	CMM_1960	*peptide ABC transporter, substrate-binding protein*	IV.1
9,8	CMM_2842	*sugar ABC transporter, substrate-binding protein*	IV.1
9,4	CMM_0345	*conserved secreted protein*	V.2
9,4	CMM_2843	*sugar ABC transporter, permease component*	IV.1
9,3	pCM1_0007	*hypothetical protein*	IV.2
9,3	CMM_1245	*sugar ABC transporter, permease component*	IV.1
9,0	CMM_1957	*peptide ABC transporter, ATPase*	IV.1
8,7	CMM_1208 (*lipA*)	*lipoyl synthase*	I.5
8,4	CMM_1956	*monooxygenase*	V.1
7,8	CMM_1243	*sugar ABC transporter, substrate-binding protein*	IV.1
7,8	CMM_1478	*oligopeptide ABC transporter, substrate-binding protein*	IV.1
7,5	CMM_1448	*hypothetical protein*	V.2
7,5	CMM_2400	*O-acetylhomoserine (thiol)-lyase*	I.2
7,3	CMM_0428	*phosphoketolase*	I.1
7,0	CMM_0445	*conserved hypothetical protein*	V.2
6,8	CMM_0521	*oxidoreductase/dehydrogenase*	V.1
6,6	CMM_1849	*flavin-dependent reductase/monooxygenase*	V.1
6,3	CMM_0186	*oxidoreductase/monooxygenase*	V.1
6,3	CMM_0265	*conserved hypothetical protein*	V.2
6,0	CMM_0145	*conserved secreted protein*	V.2
5,9	CMM_2330	*conserved secreted protein*	V.2
5,9	CMM_2527	*oxidoreductase*	V.1
5,8	CMM_2731	*sugar ABC transporter, permease component*	IV.1
5,4	CMM_2730	*sugar ABC transporter, permease component*	IV.1
5,3	CMM_0366	*nucleoside-diphosphate-sugar epimerase*	I.1
5,2	CMM_2844	*sugar ABC transporter, ATPase*	IV.1
5,2	CMM_2060	*cysteine peptidase, family C56*	IV.7
5,2	CMM_1829	*dihydroxyacetone kinase*	I.1
5,1	CMM_2235	*ATPase/ribonuclease*	V.1
5,0	CMM_0430	*hypothetical secreted protein, putative cell-surface protein*	II.2
4,8	CMM_1265	*conserved secreted protein*	V.2
4,8	CMM_0866	*alpha-glucoside ABC transporter, substrate-binding protein*	IV.1
4,8	CMM_2845	*conserved hypothetical protein, putative monooxygenase*	V.2
4,8	CMM_1662 (*fadA*)	*3-oxoacyl-CoA thiolase*	I.4
4,6	CMM_0813	*acyl-CoA oxidase*	I.4
4,5	CMM_0678 (*pknC*)	*serine/threonine protein kinase*	IV.3
4,5	CMM_0185 (*metC*)	*O-acetylhomoserine (thiol)-lyase*	I.2
4,5	CMM_2857	*hypothetical secreted protein*	V.2
4,3	CMM_1949	*MFS permease*	IV.1
4,2	CMM_2563 (*livM*)	*branched-chain amino acid ABC transporter, permease component*	IV.1
4,1	CMM_1075	*hypothetical protein*	V.2
4,1	CMM_0104	*sugar permease, MFS superfamily*	IV.1
4,1	CMM_2196 (*gcvH*)	*glycine cleavage system, H protein*	I.2
4,0	CMM_0184 (*metE1*)	*methionine synthase II*	I.2
4,0	CMM_2665	*putative sugar phosphate isomerase/epimerase*	V.2
4,0	CMM_2197 (*gcvT*)	*aminomethyltransferase*	I.2
3,9	CMM_0581	*putative general stress response protein*	IV.4
3,8	CMM_1266	*Zn-metalloprotease*	IV.7
3,7	CMM_0661	*conserved hypothetical protein, putative NTPase*	V.2
3,7	CMM_2107	*sugar ABC transporter, permease component*	IV.1
3,7	CMM_1827	*PTS system hybrid protein*	IV.1
3,7	CMM_0367 (*phnD*)	*phosphonate ABC transporter, substrate-binding protein*	IV.1
3,5	CMM_0630 (*rocD*)	*ornithine aminotransferase*	I.2
3,5	CMM_0641	*hypothetical protein*	V.2

Fortsetzung Tabelle 25: Höhere Transkriptmengen in XMM-Medium als in TBY-Medium.

3,5	CMM_1530 (*proW*)	*proline/glycine/betaine/choline ABC transporter, permease component*	IV.1
3,5	CMM_0911	*hypothetical protein (sortase-sorted)*	II.2
3,4	CMM_1207	*transcriptional regulator, PadR family*	IV.3
3,4	CMM_1661 (*fadB*)	*enoyl-CoA hydratase / 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase*	I.4
3,4	pCM2_0038	*hypothetical protein*	V.2
3,4	CMM_2213	*conserved hypothetical protein, universal stress protein*	IV.4
3,3	CMM_2108	*sugar ABC transporter, permease component*	IV.1
3,3	CMM_0859	*oxidoreductase*	V.1
3,2	CMM_2031	*ABC transporter, permease component*	IV.1
3,2	CMM_1529 (*proV*)	*proline/glycine/betaine/choline ABC transporter, ATPase*	IV.1
3,2	CMM_1945	*acyl-CoA dehydrogenase*	V.1
3,2	CMM_2074	*conserved hypothetical protein, putative DNA ligase*	III.1
3,1	CMM_0640	*conserved hypothetical protein*	I.4
3,1	CMM_2564 (*livG*)	*branched-chain amino acid ABC transporter, ATPase*	IV.1
3,1	CMM_1132	*pyridine nucleotide-disulphide oxidoreductase*	I.1
3,1	CMM_2535 (*sbtB*)	*subtilisin-like extracellular serine protease, peptidase family S8A*	IV.6
3,1	CMM_2565 (*livF*)	*branched-chain amino acid ABC transporter, ATPase*	IV.1
3,1	CMM_2007 (*gluA*)	*glutamate ABC transporter, ATPase*	IV.1
3,1	CMM_0429	*conserved secreted protein*	V.2
3,0	CMM_2112	*conserved hypothetical protein, putative phosphotransferase*	V.2
3,0	CMM_1101	*transcriptional regulator, TetR family*	IV.3
3,0	CMM_1312	*iron ABC transporter, permease component*	IV.1
2,9	CMM_0417	*conserved hypothetical protein*	V.2
2,9	CMM_1244	*sugar ABC transporter, ATPase*	IV.1
2,9	CMM_0685	*antimicrobial peptide ABC transporter, permease component*	IV.1
2,9	CMM_0684	*antimicrobial peptide ABC transporter, ATPase*	IV.1
2,9	CMM_2210	*putative two-component system, response regulator*	V.2
2,9	CMM_0663	*carboxylesterase, type B*	V.1
2,9	CMM_2064	*conserved hypothetical protein*	V.2
2,9	CMM_2006 (*gluB*)	*glutamate ABC transporter, substrate-binding protein*	IV.1
2,9	CMM_1955	*conserved hypothetical protein*	V.2
2,9	CMM_0195	*hypothetical protein*	V.2
2,9	CMM_2562 (*livH*)	*branched-chain amino acid ABC transporter, permease protein*	IV.1
2,9	CMM_2901	*hypothetical protein*	V.2
2,8	CMM_1102	*efflux MFS permease*	IV.1
2,8	CMM_2195 (*gcvP*)	*glycine dehydrogenase [decarboxylating]*	I.2
2,8	CMM_2278	*monooxygenase, flavin-dependent*	V.1
2,8	CMM_1071	*hypothetical protein*	V.2
2,8	CMM_1946	*oxidoreductase/monooxygenase*	V.1
2,8	CMM_0610	*glyoxylase family protein*	IV.5
2,7	CMM_2059	*hypothetical secreted protein*	V.2
2,7	CMM_2592	*phosphoenolpyruvate-protein phosphotransferase, PTS enzyme I*	IV.1
2,7	CMM_0303	*short chain oxidoreductase*	V.1
2,7	CMM_1664	*conserved hypothetical protein*	V.2
2,7	CMM_2382	*conserved hypothetical protein, putative perforin*	V.2
2,6	CMM_0796 (*trxC*)	*thioredoxin*	IV.5
2,6	CMM_1041 (*bglK*)	*beta-glucosidase, glycosyl hydrolase family 3*	I.1
2,6	CMM_2098	*short chain dehydrogenase/oxidoreductase*	V.1
2,6	CMM_2106	*sugar ABC transporter, substrate-binding protein*	IV.1
2,6	CMM_0873 (*metB*)	*cystathionine gamma-synthase*	I.2
2,6	CMM_0296	*sugar ABC transporter, substrate-binding protein*	IV.1
2,5	CMM_0392	*conserved membrane protein*	V.2
2,5	CMM_0681 (*fabB*)	*3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase*	I.4
2,5	CMM_0479	*putative alkaline stress protein*	IV.4
2,5	CMM_2277	*regulatory protein, zinc-finger*	V.2
2,5	CMM_0407	*hydrolase, alpha/beta hydrolase fold family*	V.1
2,5	CMM_1364	*lyase*	IV.5
2,4	CMM_0683 (*coaBC*)	*pantothenate metabolism flavoprotein*	I.5
2,4	CMM_1831 (*glpK*)	*glycerol kinase*	IV.1
2,4	CMM_2036	*hypothetical secreted protein*	V.2
2,4	CMM_2281	*metal ABC transporter, permease component*	IV.1

Fortsetzung Tabelle 25: Höhere Transkriptmengen in XMM-Medium als in TBY-Medium.

2,4	CMM_1632	*conserved hypothetical protein*	V.2
2,4	CMM_0246	*hypothetical protein*	V.2
2,4	CMM_0105 (*ramA*)	*alpha-rhamnosidase*	I.1
2,4	CMM_0033	*conserved hypothetical protein*	V.2
2,3	CMM_1425	*conserved hypothetical protein*	V.2
2,3	CMM_1953	*conserved hypothetical protein*	V.2
2,2	pCM2_0067	*hypothetical protein*	V.2
2,2	CMM_2533	*ABC-transporter, permease component*	IV.1
2,2	CMM_0976	*ABC transporter, substrate-binding protein*	IV.1
2,2	CMM_2547 (*sucD*)	*succinyl-CoA ligase [ADP-forming], subunit alpha*	I.1
2,2	CMM_2081	*Mn2+/Fe2+ transport protein, NRAMP family*	IV.1
2,2	CMM_0344	*transcriptional regulator, AraC family*	IV.3
2,2	CMM_1828	*dihydroxyacetone kinase*	I.1
2,1	CMM_2063	*short chain dehydrogenase/oxidoreductase*	V.1
2,1	CMM_1791	*anion ABC transporter, ATPase*	IV.1
2,1	CMM_2211	*hypothetical protein*	V.2
2,1	CMM_1612A	*hypotheticl protein*	V.2
2,1	CMM_0883 (*bglJ*)	*beta-glucosidase*	I.1
2,1	CMM_0522	*hypothetical protein*	V.2
2,1	CMM_1954	*conserved hypothetical protein*	V.2
2,1	CMM_0897	*cell surface protein, putative adhesin*	II.2
2,1	pCM2_0040	*hypothetical protein*	V.2
2,0	CMM_2643	*conserved hypothetical protein*	V.2
2,0	CMM_2924	*hypothetical membrane protein*	V.2
2,0	CMM_1753	*conserved hypothetical protein*	V.2
2,0	CMM_0132	*conserved secreted protein*	V.2
2,0	CMM_2590 (*mtlF*)	*PTS system, mannitol-specific IIA component*	IV.1
2,0	CMM_1601 (*wcmH*)	*glycosyltransferase*	II.2
2,0	CMM_2316	*putative phosphomutase/lyase*	V.2
1,9	CMM_1533	*hypothetical protein*	V.2
1,9	CMM_2591 (*mtlA*)	*PTS system, mannitol-specific IIBC component*	IV.1
1,9	CMM_0872 (*cysB*)	*cystathionine beta-synthase*	I.2
1,9	CMM_0342	*hypothetical protein*	V.2
1,9	CMM_0288	*oxidoreductase*	V.1
1,8	CMM_2521 (*folD*)	*methylenetetrahydrofolate dehydrogenase/ methenyltetrahydrofolate cyclohydrolase*	I.5
1,8	CMM_0409	*oxidoreductase*	V.1
1,8	CMM_1320 (*rsrA*)	*anti-sigma factor*	IV.3
1,8	CMM_1032	*conserved hypothetical protein*	V.2
1,8	CMM_1430 (*treZ*)	*maltooligosyl trehalose trehalohydrolase*	I.1
1,8	CMM_1236	*hypothetical protein*	V.2
1,8	CMM_1426	*conserved hypothetical protein*	V.2
1,8	CMM_2005 (*gluC*)	*glutamate ABC transpoter, permease component*	IV.1
1,8	CMM_2020	*rRNA methylase*	III.3
1,8	CMM_0284	*hypothetical secreted protein*	V.2
1,7	CMM_1313	*iron ABC transporter, ATPase*	IV.1
1,7	CMM_0240	*short chain alcohol dehydrogenase*	V.1
1,7	CMM_1562	*conserved hypothetical protein*	V.2
1,7	CMM_2432	*aldo/keto reductase*	V.1
1,7	CMM_1468 (*dcpA*)	*peptidyl-dipeptidase*	I.2
1,7	CMM_1907	*hypothetical protein*	V.2
1,7	CMM_0741	*conserved membrane protein*	IV.1
1,7	CMM_2140	*conserved hypothetical protein*	V.2
1,7	CMM_1398	*glycosidase*	I.1
1,6	CMM_1948 (*ppaI*)	*extracellular serine protease*	IV.6
1,6	CMM_0216	*Zn-dependent oxidoreductase*	V.1
1,6	CMM_0043 (*pelA1*)	*pectate lyase*	IV.6
1,6	CMM_2205	*acetyltransferase, GNAT family*	V.1
1,6	CMM_1268	*NAD-dependent epimerase*	I.1
1,6	CMM_1479	*transcriptional regulator, TetR family*	IV.3
1,6	CMM_2212	*amino acid permease, APC family*	IV.1
1,6	CMM_0513 (*pgmA*)	*phosphoglucomutase*	I.1
1,6	CMM_2057	*2,5-diketo-D-gluconic acid reductase*	I.1
1,6	CMM_1469	*methylase*	V.1
1,5	CMM_2324	*hypothetical secreted protein*	V.2

Fortsetzung Tabelle 25: Höhere Transkriptmengen in XMM-Medium als in TBY-Medium.

1,5	CMM_1944	*hypothetical membrane protein*	V.2
1,5	CMM_1239	*multidrug ABC transporter, ATPase*	IV.1
1,5	CMM_2681	*conserved hypothetical protein, putative hydrolase*	V.2
1,5	CMM_2405 (*sdaA*)	*L-serine dehydratase*	I.2
1,5	CMM_1134	*arginase*	I.2
1,5	CMM_0114	*conserved hypothetical protein*	V.2
1,5	CMM_1837 (*qcrB*)	*menaquinol-cytochrome C reductase, cytochrome B subunit*	I.1
1,5	CMM_0679	*acetyltransferase*	V.1
1,5	CMM_2848	*short chain dehydrogenase/oxidoreductase*	V.1
1,5	CMM_1222	*hydrolase*	V.1
1,5	CMM_0693	*hypothetical secreted protein*	V.2
1,5	CMM_0783	*transcriptional regulator, Cro/CI family*	IV.3
1,5	CMM_0899	*conserved membrane protein*	V.2
1,5	CMM_2095B	*hypothetical protein*	V.2
1,5	CMM_1423	*sulfite oxidase*	I.2
1,5	CMM_2352	*conserved hypothetical protein*	V.2
1,4	CMM_1431 (*treY*)	*maltooligosyltrehalose synthase*	I.1
1,4	CMM_0090 (*tomA*)	*tomatinase, endo-1,4-beta-glycosidase*	IV.6
1,4	CMM_2896	*hypothetical membrane protein*	V.2
1,4	CMM_1140	*pyridoxamine-phosphate oxidase*	I.5
1,4	CMM_0645	*two-component system, sensor kinase*	IV.3
1,4	CMM_2742	*hydrolase*	V.1
1,4	CMM_2548 (*sucC*)	*succinyl-CoA ligase [ADP-forming], subunit beta*	I.1
1,4	CMM_1513	*Zn-dependent oxidoreductase*	V.1
1,4	CMM_2394	*hypothetical membrane protein*	V.2
1,4	CMM_1687 (*tatA*)	*Sec-independent twin-arginine protein translocase protein*	IV.2
1,4	pCM2_0001	*conserved hypothetical protein*	V.2
1,4	CMM_0942	*ribokinase*	I.1
1,4	CMM_0739	*acetyltransferase*	V.1
1,4	CMM_0962 (*ribC*)	*riboflavin synthase, alpha chain*	I.5
1,4	CMM_1698	*nucleoside-diphosphate-sugar epimerase*	I.1
1,4	CMM_0350	*carbohydrate kinase*	I.1
1,4	CMM_1718	*glycosyltransferase*	II.2
1,4	CMM_0593	*conserved hypothetical protein*	I.5
1,3	CMM_1238	*conserved membrane protein*	V.2
1,3	CMM_0604 (*pfkA*)	*6-phosphofructokinase*	I.1
1,3	CMM_2805	*conserved hypothetical protein, putative signal peptidase*	IV.2
1,3	CMM_PS_05 (*chpA*)	*extracellular serine protease*	IV.6
1,3	CMM_0391	*hypothetical secreted protein*	V.2
1,2	CMM_1382	*sugar MFS permease*	IV.1
1,2	CMM_1742 (*tpiA*)	*triosephosphate isomerase*	I.1
1,2	CMM_0526	*hypothetical protein*	V.2
1,2	CMM_1743 (*pgkA*)	*phosphoglycerate kinase*	I.1
1,2	CMM_2389	*permease, DMT family*	IV.1
1,2	CMM_1036 (*copP*)	*copper binding protein*	IV.5

Tabelle 26: Mittels Microarray-Experiment ermittelte *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*-Gene, deren Transkriptmengen in XMM-Medium im Vergleich mit TBY-Medium erniedrigt waren. 267 Gene wurden identifiziert, von denen 115 eine 2- oder mehrfach veränderte Transkriptmenge zeigten. Die Gene wurden nach dem absteigenden FCA-Wert geordnet. FCA: *fold change absolute*, SBP: *substrate-binding protein*.

FCA	Gen-Name	Mögliche Funktion	COG
19,4	CMM_0616	*conserved secreted protein*	V.2
15,0	CMM_0022	*conserved membrane protein*	V.2
14,9	CMM_2878	*citrate transporter, CitMHS family*	IV.1
10,6	CMM_0617	*putative copper resistance protein*	IV.5
9,5	CMM_1081	*hypothetical secreted protein*	V.2
9,2	CMM_0023	*two-component system, response regulator*	IV.3
8,0	CMM_2898 (*aldA*)	*L-alanine dehydrogenase*	I.2
7,3	CMM_0671	*conserved membrane protein*	V.2
6,6	CMM_2699	*sugar ABC transporter, substrate-binding protein*	IV.1
6,5	CMM_1078	*transcriptional regulator, TetR family*	IV.3

Fortsetzung Tabelle 26: Niedrigere Transkriptmengen in XMM-Medium als in TBY-Medium.

5,6	CMM_2543 (*ddaH*)	*dimethylarginine dimethylaminohydrolase*	I.2
5,5	CMM_1079	*drug exporter, RND family*	IV.1
5,0	CMM_0709	*stress-induced protein, putative organic hydroperoxide resistance protein*	IV.5
4,9	CMM_1701	*glycine/betaine/carnitin ABC transporter ATPase*	IV.1
4,5	CMM_1993	*3-methyladenine DNA glycosylase*	III.1
4,3	CMM_0025 (*rpmJ2*)	*50S ribosomal protein L36 2*	III.3
4,1	CMM_0397	*ABC transporter, ATPase*	IV.1
4,0	CMM_1377	*conserved hypothetical protein, putative endonuclease*	III.1
4,0	CMM_0153 (*dnaJ1*)	*chaperone, curved DNA-binding protein*	IV.4
3,8	CMM_1726	*ABC transporter ATPase*	IV.1
3,6	CMM_0396	*Na+ efflux ABC transporter, permease component*	IV.1
3,6	CMM_1818	*glutamine amidotransferase, subunit pdxT*	I.5
3,5	CMM_0394	*conserved hypothetical protein*	V.2
3,5	CMM_2484	*putative protein-disulfide isomerase*	IV.4
3,5	CMM_0643	*oxidoreductase*	V.1
3,4	CMM_1506	*short chain dehydrogenase/oxidoreductase*	V.1
3,2	CMM_2575 (*acpS*)	*holo-[acyl-carrier-protein] synthase*	I.4
3,1	CMM_2214	*thiol-disulfide oxidoreductase*	IV.5
3,1	CMM_0587 (*hemE*)	*uroporphyrinogen decarboxylase*	I.5
3,1	CMM_0861 (*rplL*)	*50S ribosomal protein L7/L12*	III.3
3,0	CMM_2650	*cationic amino acid permease, APC family*	IV.1
3,0	CMM_1486	*conserved membrane protein*	V.2
2,9	CMM_2180	*peptide ABC transporter, substrate-binding protein*	IV.1
2,9	CMM_0964	*hydrolase*	V.1
2,9	CMM_2441	*conserved membrane protein*	V.2
2,9	CMM_1407 (*gatC*)	*glutamyl-tRNA(Gln) amidotransferase, subunit C*	III.3
2,8	CMM_2552 (*glpQ1*)	*glycerophosphoryl diester phosphodiesterase*	I.4
2,8	CMM_2577 (*coaA*)	*pantothenate kinase*	I.5
2,8	CMM_1076	*small-conductance mechanosensitive channel*	IV.1
2,8	CMM_1704	*DNA or RNA helicase*	III.1
2,7	CMM_2494 (*phoU*)	*phosphate transport system regulator*	IV.3
2,7	CMM_0413	*hypothetical protein*	V.2
2,7	CMM_0860 (*rplJ*)	*50S ribosomal protein L10*	III.3
2,7	CMM_2381	*duplicated acetyltransferase*	V.1
2,7	CMM_1547 (*leuS*)	*leucyl-tRNA synthetase*	III.3
2,6	CMM_1410	*ABC transporter ATPase*	IV.1
2,6	CMM_2777	*putative recombinase/nuclease*	V.2
2,6	CMM_2951	*hypothetical membrane protein*	V.2
2,6	CMM_1356	*conserved hypothetical protein*	V.2
2,5	CMM_2745	*putative F420-dependent NADP reductase*	V.2
2,5	CMM_1651	*topoisomerase II, subunit A*	III.1
2,5	CMM_1647 (*murX*)	*UDP-N-acetylmuramyl tripeptide synthase*	II.2
2,5	CMM_0874 (*rnhA*)	*ribonuclease H*	III.2
2,5	CMM_1758 (*pykA*)	*pyruvate kinase*	I.1
2,4	CMM_1564 (*hrcA*)	*heat-inducible transcriptional repressor*	IV.3
2,4	CMM_0947	*beta-glycosidase*	I.1
2,4	CMM_1311 (*smpB*)	*tmRNA (SsrA)-binding protein*	III.3
2,4	CMM_2791 (*murB*)	*UDP-N-acetylmuramate dehydrogenase*	II.2
2,4	CMM_1759 (*gltD*)	*glutamate synthase (NADPH), beta subunit*	I.2
2,3	CMM_1909 (*cpsY*)	*UDP-glucose 4-epimerase*	I.1
2,3	CMM_2899	*leucine-responsive regulatory protein, AsnC family*	IV.3
2,3	CMM_0568	*phosphoglycerate mutase*	I.1
2,3	CMM_2476	*two-component system, sensor kinase*	IV.3
2,3	CMM_2144 (*truB*)	*tRNA pseudouridine synthase B*	III.3
2,3	CMM_0337	*conserved secreted protein, putative carboxypeptidase or PBP*	V.2
2,3	CMM_2964 (*pcnA*)	*RNA nucleotidyltransferase*	III.3
2,3	CMM_0024	*two-component system, sensor kinase*	IV.3
2,3	CMM_1200 (*uvrD3*)	*ATP-dependent DNA helicase*	III.1
2,3	CMM_2013	*conserved hypothetical protein*	V.2
2,3	CMM_2530	*putative hydrolase, HAD family*	V.2
2,3	CMM_2475	*two-component system, response regulator*	IV.3
2,3	CMM_2797 (*aglC*)	*alpha-glucosidase, glycosyl hydrolase family 13*	I.1
2,3	CMM_2541	*ABC transporter, fused permease and ATPase*	IV.1

Fortsetzung Tabelle 26: Niedrigere Transkriptmengen in XMM-Medium als in TBY-Medium.

2,3	CMM_2906	*transcriptional regulator, GntR family*	IV.3
2,2	CMM_0580	*conserved hypothetical protein, putative ester cyclase*	V.2
2,2	CMM_1095 (*ilvH*)	*acetolactate synthase, small (regulatory) subunit*	I.2
2,2	CMM_1565 (*dnaJ2*)	*chaperone*	IV.4
2,2	CMM_2865	*conserved hypothetical protein, putative nuclease*	V.2
2,2	CMM_1693	*conserved hypothetical protein*	V.2
2,2	CMM_1792 (*nusB*)	*N utilization substance protein B homolog*	III.2
2,1	CMM_2174	*possibly involved in mycothiol synthesis*	IV.5
2,1	CMM_2833	*MFS permease*	IV.1
2,1	CMM_0871	*conserved hypothetical protein*	V.2
2,1	CMM_2244 (*greA*)	*transcription elongation factor*	III.2
2,1	CMM_1376	*conserved hypothetical protein*	V.2
2,1	CMM_1409 (*gatB*)	*aspartyl/glutamyl-tRNA(Asn/Gln) amidotransferase, subunit B*	III.3
2,1	CMM_1408 (*gatA*)	*glutamyl-tRNA(Gln) amidotransferase, subunit A*	III.3
2,1	CMM_2976	*conserved hypothetical protein*	V.2
2,1	CMM_2003 (*pheS*)	*phenylalanyl-tRNA synthetase, alpha subunit*	III.3
2,1	CMM_1005	*transcriptional regulator*	IV.3
2,1	CMM_1750 (*uvrB*)	*excinuclease ABC, subunit B*	III.1
2,1	CMM_2123	*hypothetical membrane protein*	V.2
2,1	CMM_1771 (*hisE*)	*phosphoribosyl-ATP pyrophosphatase*	I.2
2,1	CMM_2142	*membrane protein*	V.2
2,1	CMM_0003 (*gndA1*)	*6-phosphogluconate dehydrogenase*	I.1
2,1	CMM_1109 (*trxB2*)	*thioredoxin reductase*	IV.5
2,1	CMM_2087	*conserved membrane protein, putative RNAse involved in tRNA maturation*	V.2
2,0	CMM_2935 (*rpsN*)	*30S ribosomal protein S14*	III.3
2,0	CMM_2551 (*uvrD1*)	*ATP-dependent DNA helicase*	III.1
2,0	CMM_2958	*conserved hypothetical protein, Zn-binding*	V.2
2,0	CMM_2078	*conserved hypothetical protein, putative nuclease*	V.2
2,0	CMM_2419	*ATP-dependent helicase*	III.1
2,0	CMM_2542	*ABC transporter, fused permease and ATPase*	IV.1
2,0	CMM_1816 (*ruvC*)	*crossover junction endodeoxyribonuclease (holliday junction resolvase)*	III.1
2,0	CMM_2956	*transcriptional regulator*	IV.3
2,0	CMM_1692	*phosphatase, HAD hydrolase family*	V.1
2,0	CMM_2480	*conserved hypothetical protein*	V.2
2,0	CMM_1017 (*wcqG*)	*membrane protein*	II.2
2,0	CMM_2223	*GTP-binding protein, obg family*	III.3
2,0	CMM_1851	*pseudouridine synthase*	III.3
2,0	CMM_0383 (*ppcA*)	*phosphoenolpyruvate carboxylase*	I.1
2,0	CMM_2936 (*rpmG*)	*50S ribosomal protein L33*	III.3
2,0	CMM_1374 (*lepB*)	*signal peptidase I*	IV.2
2,0	CMM_1307	*MFS permease*	IV.1
2,0	CMM_1384 (*tsfA*)	*elongation factor Ts (EF-Ts)*	III.3
1,9	CMM_1506A	*hypothetical protein*	V.2
1,9	CMM_1762 (*trpA*)	*tryptophan synthase, alpha chain*	I.2
1,9	CMM_2524	*hypothetical protein*	V.2
1,9	CMM_1097	*membrane protein*	V.2
1,9	CMM_0870	*conserved hypothetical protein*	V.2
1,9	CMM_1161 (*rfeA*)	*undecaprenyl phosphate alpha-N-acetylglucosa-minyltransferase*	II.2
1,9	CMM_2373	*NAD(P)H oxidoreductase*	V.1
1,9	CMM_2328	*hypothetical secreted protein*	V.2
1,9	CMM_2867	*transcriptional regulator, MarR family*	IV.3
1,9	CMM_0869	*ABC transporter, fused permease and ATPase domains*	IV.1
1,9	CMM_2229 (*xseA*)	*exodeoxyribonuclease VII, large subunit*	III.1
1,9	CMM_0535	*glycosyltransferase*	II.2
1,9	CMM_1019 (*wcqI*)	*glycosyltransferase*	II.2
1,9	CMM_2933	*conserved membrane protein, putative copper export protein*	IV.1
1,9	CMM_0002 (*dnaN*)	*DNA polymerase III, beta chain*	III.1
1,9	CMM_2866	*putative hydrolase, HAD family*	V.2
1,9	CMM_2471 (*cspB*)	*cold shock protein*	IV.4
1,9	CMM_0552	*transcriptional regulator, LacI family*	IV.3
1,8	CMM_0087	*transcriptional regulator, TetR family*	IV.3
1,8	CMM_1767 (*trpE1*)	*anthranilate synthase, component I*	I.2

Fortsetzung Tabelle 26: Niedrigere Transkriptmengen in XMM-Medium als in TBY-Medium.

1,8	CMM_1465 (*clpP2*)	*ATP-dependent Clp protease, proteolytic subunit*	IV.4
1,8	CMM_1648	*glutamine amidotransferase*	I.5
1,8	CMM_1900	*conserved membrane protein*	V.2
1,8	CMM_1181	*O-methyltransferase*	V.1
1,8	CMM_0561 (*aspS*)	*aspartyl-tRNA synthetase*	III.3
1,8	CMM_2243	*conserved hypothetical protein*	V.2
1,8	CMM_0965 (*trpS*)	*tryptophanyl-tRNA synthetase*	III.3
1,8	CMM_1793 (*efpA*)	*elongation factor P (EF-P)*	III.3
1,8	CMM_2440	*conserved hypothetical protein*	V.2
1,8	CMM_2319	*hypothetical secreted protein*	V.2
1,8	CMM_2937 (*rpmB*)	*50S ribosomal protein L28*	III.3
1,8	CMM_0607	*DNA repair protein*	III.1
1,8	CMM_1310 (*ftsX*)	*ABC transporter, permease component, involved in cell division*	IV.1
1,8	CMM_2938 (*furB*)	*ferric uptake regulator, Fur family*	IV.3
1,8	CMM_0782	*oxidoreductase*	V.1
1,8	CMM_1464 (*clpP1*)	*ATP-dependent Clp protease, proteolytic subunit*	IV.4
1,8	CMM_2264 (*hisS*)	*histidyl-tRNA synthetase*	III.3
1,7	CMM_1006 (*wcqB*)	*glycosyltransferase, mannosyltransferase*	II.2
1,7	CMM_0511	*conserved secreted protein*	V.2
1,7	CMM_2637	*conserved hypothetical protein, Zn ribbon domain*	V.2
1,7	CMM_1578 (*recO*)	*DNA repair protein /recombination protein*	III.1
1,7	CMM_1308 (*prfB*)	*peptide chain release factor RF-2*	III.3
1,7	CMM_2363 (*moeB*)	*molybdenum cofactor biosynthesis protein*	I.5
1,7	CMM_1581 (*glyS*)	*glycyl-tRNA synthetase*	III.3
1,7	CMM_1386 (*frrA*)	*ribosome-recycling factor (RRF) (ribosome-releasing factor)*	III.3
1,7	CMM_0842	*cell cycle protein*	II.1
1,7	CMM_2458	*conserved hypothetical protein*	V.2
1,7	CMM_2819	*metallopeptidase, family M13*	IV.7
1,7	CMM_1096 (*ilvC*)	*ketol-acid reductoisomerase*	I.2
1,7	CMM_0313	*transcriptional regulator, histone-like protein*	IV.3
1,7	CMM_0757 (*purF*)	*amidophosphoribosyltransferase*	I.3
1,7	CMM_1656 (*dutA*)	*deoxyuridine 5'-triphosphate pyrophosphatase*	I.3
1,7	CMM_1875	*acyltransferase*	I.4
1,7	CMM_2875	*conserved hypothetical protein*	V.2
1,7	CMM_2574 (*alrA1*)	*alanine racemase*	II.2
1,7	CMM_2977 (*rnpA*)	*ribonuclease P, protein component*	III.2
1,7	CMM_0920	*conserved hypothetical protein*	V.2
1,7	CMM_2002 (*pheT*)	*phenylalanyl-tRNA synthetase, beta subunit*	III.3
1,6	CMM_1668	*ATPase*	V.1
1,6	CMM_1857 (*ftsQ*)	*cell division protein*	II.1
1,6	CMM_2829	*transcriptional regulator*	IV.3
1,6	CMM_1002	*membrane protein*	V.2
1,6	CMM_1972	*hypothetical membrane protein*	V.2
1,6	CMM_0475 (*xthB*)	*exonuclease III*	III.1
1,6	CMM_2126	*Zn-dependent alcohol dehydrogenase*	V.1
1,6	CMM_0944	*sugar ABC transporter, substrate-binding protein*	IV.1
1,6	CMM_1977 (*rluA*)	*pseudouridine synthase*	III.3
1,6	CMM_1585 (*dgtA*)	*dGTP triphosphohydrolase*	I.3
1,6	CMM_0010 (*ppiA*)	*peptidyl-prolyl cis-trans isomerase*	IV.4
1,6	CMM_2026	*conserved hypothetical protein*	V.2
1,6	CMM_2800	*conserved membrane protein*	V.2
1,6	CMM_2145 (*apbA*)	*2-dehydropantoate 2-reductase*	I.5
1,6	CMM_1873 (*pknE*)	*serine/threonine protein kinase, eukaryotic-type*	IV.3
1,6	CMM_0896 (*ackA*)	*acetate kinase*	I.1
1,6	CMM_2853	*transcriptional regulator, MarR family*	IV.3
1,6	CMM_1777 (*metK*)	*S-adenosylmethionine synthetase*	I.5
1,6	CMM_2874	*putative RNA-binding regulator*	V.2
1,6	CMM_0532 (*panD*)	*aspartate 1-decarboxylase*	I.5
1,6	CMM_2576 (*glmS*)	*glucosamine-fructose-6-phosphate aminotransferase*	I.1
1,6	CMM_0733	*transcriptional regulator, GntR family*	IV.3
1,6	CMM_2307	*conserved membrane protein*	V.2
1,6	CMM_1150 (*argS*)	*arginyl-tRNA synthetase*	III.3
1,6	CMM_1689	*transcriptional regulator*	IV.3
1,5	CMM_2968 (*trxA*)	*thioredoxin reductase*	IV.5

Fortsetzung Tabelle 26: Niedrigere Transkriptmengen in XMM-Medium als in TBY-Medium.

1,5	CMM_1861 (*murD*)	*UDP-N-acetylmuramoylalanine-D-glutamate ligase*	II.2
1,5	CMM_1911	*dehydrogenase*	V.1
1,5	CMM_2910	*DNA glycosylase*	III.1
1,5	CMM_2965	*conserved secreted protein*	V.2
1,5	CMM_2448	*conserved hypothetical protein, putative regulatory protein*	V.2
1,5	CMM_2969	*transcriptional regulator containing an aminotransferase domain*	IV.3
1,5	CMM_1930	*conserved hypothetical protein, putative hydrolase*	V.2
1,5	CMM_2756	*esterase/lipase*	V.1
1,5	CMM_1013 (*rmlA*)	*glucose-1-phosphate thymidylyltransferase*	II.2
1,5	CMM_1179	*conserved membrane protein*	V.2
1,5	CMM_0215	*transcriptional regulator, TetR family*	IV.3
1,5	CMM_0670	*hypothetical protein*	V.2
1,5	CMM_1003 (*purK*)	*phosphoribosylaminoimidazole carboxylase, ATPase subunit*	I.3
1,5	CMM_0574	*cytosine-specific DNA methylase*	III.1
1,4	CMM_0588 (*hemY*)	*protoporphyrinogen oxidase*	I.5
1,4	CMM_2880	*conserved hypothetical protein*	V.2
1,4	CMM_2230 (*xseB*)	*exonuclease VII, small subunit*	III.1
1,4	CMM_2768	*conserved membrane protein, TerC family*	IV.1
1,4	CMM_1690	*peptidyl-prolyl cis-trans isomerase*	IV.4
1,4	CMM_0080	*conserved hypothetical protein*	V.2
1,4	CMM_0984	*phosphotransferase system, mannitol/fructose-specific IIA domain*	IV.1
1,4	CMM_1881	*ATPase*	II.1
1,4	CMM_0624 (*npsC*)	*non-ribosomal peptide synthase*	I.6
1,4	CMM_1997 (*argF*)	*ornithine carbamoyltransferase*	I.2
1,4	CMM_2274 (*prsA*)	*ribose-phosphate pyrophosphokinase*	I.3
1,4	CMM_2296	*hypothetical protein*	V.2
1,4	CMM_0990 (*lpdA*)	*dihydrolipoamide dehydrogenase*	I.1
1,4	CMM_1098	*membrane protein*	V.2
1,4	CMM_1864 (*murE*)	*UDP-N-acetylmuramoylalanyl-D-glutamate-2,6-diaminopimelate ligase*	II.2
1,4	CMM_2972 (*parA*)	*chromosome partitioning protein*	II.1
1,4	CMM_0347 (*manX*)	*alpha-mannosidase*	I.1
1,4	CMM_0728 (*purL*)	*phosphoribosylformylglycinamidine synthase II*	I.3
1,4	CMM_2219	*conserved hypothetical protein*	V.2
1,4	CMM_1607 (*wcmM*)	*serine acetyltransferase*	II.2
1,4	CMM_0877 (*araD*)	*L-ribulose-5-phosphate 4-epimerase*	I.1
1,4	CMM_0946	*sugar ABC transporter, permease component*	IV.1
1,4	CMM_2496	*methylase*	V.1
1,4	CMM_2034	*hydrolase, metallo-beta-lactamase superfamily*	IV.5
1,4	CMM_0854 (*lysS*)	*lysyl-tRNA synthetase*	III.3
1,3	CMM_0529	*hypothetical protein*	V.2
1,3	CMM_2015 (*hisH*)	*imidazole glycerol phosphate synthase subunit*	I.2
1,3	pCM2_0013 (*traA*)	*conjugal transfer protein, Dtr system*	IV.2
1,3	CMM_1835 (*qcrC*)	*ubiquinol-cytochrome c reductase, cytochrome c subunit*	I.1
1,3	CMM_1566	*rRNA methyltransferase*	III.3
1,3	pCM2_0058	*hypothetical protein*	V.2
1,3	CMM_2973	*16S rRNA 7-methylguanosine methyltransferase*	III.3
1,3	CMM_2326	*permease*	IV.1
1,3	CMM_2470	*conserved hypothetical protein*	V.2
1,3	CMM_2735 (*glpX*)	*fructose-1,6-bisphosphatase*	I.1
1,3	CMM_1571 (*eraA*)	*GTP-binding protein, era family*	III.3
1,3	CMM_2940	*metal ABC transporter, ATPase*	IV.1
1,3	CMM_1452	*thioesterase*	I.4
1,3	CMM_2393	*conserved membrane protein*	V.2
1,3	CMM_0712	*conserved hypothetical protein, putative nuclease*	V.2
1,3	CMM_1858 (*murC*)	*UDP-N-acetylmuramate-L-alanine ligase*	II.2
1,3	CMM_PS_11	*CMM_PS_11*	V.2
1,3	CMM_2369	*DNase*	III.1
1,2	CMM_1442	*thioredoxin*	IV.5
1,2	CMM_0214	*conserved hypothetical protein*	V.2
1,2	CMM_1362 (*ftsY*)	*signal recognition particle component*	IV.2
1,2	CMM_1354 (*recG*)	*ATP-dependent DNA helicase*	III.1
1,2	CMM_1201	*conserved hypothetical protein*	V.2

Fortsetzung Tabelle 26: Niedrigere Transkriptmengen in XMM-Medium als in TBY-Medium.

1,2	CMM_0092 (*regA*)	*two-component system, sensor kinase*	IV.3
1,1	CMM_2266	*pyrophosphatase*	I.6
1,1	CMM_1202	*conserved hypothetical protein*	V.2
1,1	CMM_0456	*hypothetical protein*	V.2
1,1	CMM_1001	*hypothetical membrane protein*	V.2
1,1	CMM_1722	*3-oxoacyl-[acyl-carrier protein] reductase*	I.4

Tabelle 27: Mittels Microarray-Experiment ermittelte *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*-Gene, deren Transkriptmengen in M9-Medium im Vergleich mit TBY-Medium erhöht waren. 315 Gene wurden identifiziert, von denen 127 eine 2- oder mehrfach erhöhte Transkriptmenge zeigten. Die Gene wurden nach dem absteigenden FCA-Wert geordnet. FCA: *fold change absolute*, SBP: *substrate-binding protein*.

FCA	Gen-Name	Mögliche Funktion	COG
24,2	CMM_1790	*anion ABC transporter, substrate-binding protein*	IV.1
19,7	CMM_1973	*acyl-CoA dehydrogenase*	V.1
17,8	CMM_1956	*monooxygenase*	V.1
14,4	CMM_1957	*peptide ABC transporter, ATPase*	IV.1
14,2	CMM_1789	*anion ABC transporter, permease component*	IV.1
13,4	CMM_2871 (*gpaA*)	*polygalacturonase*	IV.6
11,9	CMM_1499	*hypothetical protein*	V.2
11,7	CMM_0186	*oxidoreductase/monooxygenase*	V.1
10,7	CMM_2526	*MFS permease*	IV.1
9,1	CMM_1035	*conserved hypothetical protein*	V.2
8,4	CMM_0346	*conserved membrane protein*	V.2
8,4	CMM_1466	*monooxygenase*	V.1
8,0	CMM_1523	*acetyltransferase*	V.1
7,7	CMM_0428	*phosphoketolase*	I.1
7,6	CMM_2277	*regulatory protein, zinc-finger*	V.2
7,5	CMM_0049 (*nagA*)	*beta-N-acetylglucosaminidase*	I.1
7,5	pCM1_0006	*hypothetical protein*	IV.2
7,3	CMM_0430	*hypothetical secreted protein, putative cell-surface protein*	II.2
7,1	CMM_0445	*conserved hypothetical protein*	V.2
6,8	CMM_2400	*O-acetylhomoserine (thiol)-lyase*	I.2
6,6	CMM_2729	*conserved hypothetical protein (sortase-sorted)*	II.2
6,5	CMM_0044 (*ppaC*)	*extracellular serine protease*	IV.6
6,3	CMM_1478	*oligopeptide ABC transporter, substrate-binding protein*	IV.1
6,3	CMM_PS_10 (*chpB*)	*pseudogene, extracellular serine protease, family S1A*	IV.6
6,1	CMM_2401	*conserved hypothetical protein, CoA-binding*	V.2
6,1	CMM_0051 (*pelA2*)	*pectate lyase*	IV.6
5,7	CMM_1955	*conserved hypothetical protein*	V.2
5,6	CMM_1207	*transcriptional regulator, PadR family*	IV.3
5,4	CMM_2761	*hypothetical protein*	V.2
5,3	CMM_1929	*quinone oxidoreductase*	I.1
5,0	CMM_1433	*conserved hypothetical protein*	V.2
5,0	CMM_2096	*hypothetical protein*	V.2
4,9	CMM_1849	*flavin-dependent reductase/monooxygenase*	V.1
4,8	CMM_0319	*conserved hypothetical protein*	V.2
4,7	CMM_1208 (*lipA*)	*lipoyl synthase*	I.5
4,7	CMM_1239	*multidrug ABC transporter, ATPase*	IV.1
4,5	CMM_2282	*metal ABC transporter, ATPase*	IV.1
4,4	CMM_1899	*Zn-dependent dehydrogenase*	V.1
4,3	CMM_0185 (*metC*)	*O-acetylhomoserine (thiol)-lyase*	I.2
4,3	CMM_1788 (*acsA2*)	*acetyl-coenzyme A synthetase*	I.4
4,1	CMM_0593	*conserved hypothetical protein*	I.5
3,9	CMM_0600	*DNA/RNA endonuclease*	III.2
3,9	CMM_0053 (*chpF*)	*extracellular serine protease, family S1A (Chymotrypsin)*	IV.6
3,9	CMM_1524	*nicotinamide mononucleotide transporter, PnuC family*	IV.1
3,8	CMM_1123 (*sgaH*)	*hexulose-6-phosphate synthase*	I.1
3,6	CMM_1237	*NDP-sugar phosphate epimerase*	I.1
3,6	CMM_1958	*peptide ABC transporter, permease component*	IV.1
3,5	CMM_1953	*conserved hypothetical protein*	V.2
3,4	CMM_1611 (*cspA1*)	*cold shock protein*	IV.4

Fortsetzung Tabelle 27: Höhere Transkriptmengen in M9-Medium als in TBY-Medium.

3,4	CMM_2133	*lipase/esterase*	V.1
3,4	CMM_1320 (*rsrA*)	*anti-sigma factor*	IV.3
3,4	CMM_0239	*hypothetical secreted protein*	V.2
3,4	CMM_1954	*conserved hypothetical protein*	V.2
3,4	CMM_2209	*transcriptional regulator, MarR family*	IV.3
3,3	CMM_1335 (*metX*)	*homoserine O-acetyltransferase*	I.2
3,3	CMM_2281	*metal ABC transporter, permease component*	IV.1
3,2	CMM_1526	*oxidoreductase*	V.1
3,2	CMM_0098	*transcriptional regulator, LacI family*	IV.3
3,2	CMM_0402	*hypothetical protein*	V.2
3,1	CMM_2655	*transcriptional regulator*	IV.3
3,1	CMM_0581	*putative general stress response protein*	IV.4
3,0	CMM_0043 (*pelA1*)	*pectate lyase*	IV.6
3,0	CMM_0241	*membrane protein*	V.2
3,0	CMM_1125	*transcriptional regulator, LuxR family*	IV.3
3,0	CMM_0469	*oxidoreductase*	V.1
2,9	CMM_1479	*transcriptional regulator, TetR family*	IV.3
2,9	CMM_1235	*conserved hypothetical protein*	V.2
2,8	CMM_2330	*conserved secreted protein*	V.2
2,8	pCM1_0025 (*pin*)	*DNA-invertase*	III.1
2,8	CMM_0145	*conserved secreted protein*	V.2
2,8	CMM_0328	*oxidoreductase/methylase*	I.6
2,8	CMM_2844	*sugar ABC transporter, ATPase*	IV.1
2,7	CMM_PS_16	*CMM_PS_16*	V.2
2,7	CMM_0896 (*ackA*)	*acetate kinase*	I.1
2,6	CMM_0345	*conserved secreted protein*	V.2
2,6	CMM_2061	*conserved hypothetical protein*	V.2
2,6	CMM_1525	*conserved hypothetical protein*	V.2
2,6	CMM_0796 (*trxC*)	*thioredoxin*	IV.5
2,5	CMM_1132	*pyridine nucleotide-disulphide oxidoreductase*	I.1
2,5	CMM_0895 (*ptaA*)	*phosphate acetyltransferase*	I.1
2,5	CMM_2643	*conserved hypothetical protein*	V.2
2,5	CMM_0621	*hypothetical membrane protein*	V.2
2,5	CMM_1602 (*wcmI*)	*acetyltransferase involved in polysaccharide biosynthesis*	II.2
2,4	CMM_2074	*conserved hypothetical protein, putative DNA ligase*	III.1
2,4	CMM_1601 (*wcmH*)	*glycosyltransferase*	II.2
2,4	CMM_1297 (*czcD*)	*cobalt-zinc-cadmium efflux permease, CDF family*	IV.1
2,4	pCM1_0007	*hypothetical protein*	IV.2
2,4	CMM_2315	*hypothetical protein*	V.2
2,4	CMM_0647	*transcriptional regulator, TetR family*	IV.3
2,3	CMM_1723	*conserved hypothetical protein*	V.2
2,3	CMM_0911	*hypothetical protein (sortase-sorted)*	II.2
2,3	CMM_0559	*hypothetical protein*	V.2
2,3	CMM_1236	*hypothetical protein*	V.2
2,3	CMM_0706 (*pbpB*)	*beta lactamase/penicillin-binding protein*	II.2
2,2	CMM_0746 (*prkA*)	*phosphoribulokinase*	I.1
2,2	CMM_0695	*conserved hypothetical protein*	V.2
2,2	CMM_1324	*conserved membrane protein*	V.2
2,2	CMM_1246	*hypothetical protein*	V.2
2,2	pCM2_0063	*hypothetical protein*	V.2
2,2	CMM_0640	*conserved hypothetical protein*	I.4
2,2	CMM_1251	*two-component system, sensor kinase*	IV.3
2,2	CMM_0533	*tRNA processing ribonuclease BN*	III.2
2,2	CMM_1500	*hypothetical secreted protein*	V.2
2,2	CMM_2129	*conserved hypothetical protein*	V.2
2,2	CMM_1182 (*tatB*)	*Sec-independent twin-arginine protein translocase protein*	IV.2
2,2	CMM_1791	*anion ABC transporter, ATPase*	IV.1
2,1	CMM_2211	*hypothetical protein*	V.2
2,1	CMM_1380 (*xerC*)	*integrase/recombinase*	III.1
2,1	CMM_1747	*conserved hypothetical protein, putative kinase*	V.2
2,1	CMM_1129	*siderophore-interacting protein*	I.6
2,1	CMM_2215	*hypothetical secreted protein, peptidoglycan-binding*	V.2
2,1	CMM_1266	*Zn-metalloprotease*	IV.7
2,1	CMM_0292	*conserved hypothetical protein*	V.2
2,1	CMM_0429	*conserved secreted protein*	V.2

Fortsetzung Tabelle 27: Höhere Transkriptmengen in M9-Medium als in TBY-Medium.

2,0	CMM_1446 (*msrA*)	*peptide methionine sulfoxide reductase*	IV.5
2,0	CMM_2689	*hypothetical protein*	V.2
2,0	CMM_1325	*conserved membrane protein*	V.2
2,0	CMM_0661	*conserved hypothetical protein, putative NTPase*	V.2
2,0	CMM_2112	*conserved hypothetical protein, putative phosphotransferase*	V.2
2,0	CMM_2060	*cysteine peptidase, family C56*	IV.7
2,0	CMM_0641	*hypothetical protein*	V.2
2,0	CMM_1461 (*dpsA*)	*stress induced DNA-binding protein*	IV.5
2,0	CMM_0506	*membrane protein*	V.2
2,0	CMM_1131	*conserved hypothetical protein*	V.2
2,0	CMM_2042 (*pepR*)	*metallopeptidase, M16 family*	IV.7
2,0	CMM_0604 (*pfkA*)	*6-phosphofructokinase*	I.1
2,0	CMM_1532 (*proX*)	*proline/glycine/betaine/choline ABC transporter, SBP*	IV.1
1,9	CMM_2967 (*trxB1*)	*thioredoxin reductase*	IV.5
1,9	CMM_2027	*transcriptional regulator, Cro/CI family*	IV.3
1,9	CMM_1624	*transcriptional regulator, TetR family*	IV.3
1,9	CMM_2210	*putative two-component system, response regulator*	V.2
1,9	CMM_2339	*hypothetical membrane protein*	V.2
1,9	CMM_0872 (*cysB*)	*cystathionine beta-synthase*	I.2
1,9	CMM_1632	*conserved hypothetical protein*	V.2
1,9	pCM2_0031	*hypothetical protein*	V.2
1,9	CMM_1897	*NTP pyrophosphohydrolase*	III.1
1,9	CMM_1634 (*glnA2*)	*glutamine synthetase II*	I.2
1,9	CMM_0405	*two-component system, sensor kinase*	IV.3
1,9	CMM_1186	*membrane protein*	V.2
1,9	CMM_2178	*hypothetical secreted protein*	V.2
1,9	CMM_1612A	*hypothetical protein*	V.2
1,9	pCM2_0057	*hypothetical protein*	V.2
1,9	CMM_2848	*short chain dehydrogenase/oxidoreductase*	V.1
1,9	CMM_2734	*conserved secreted protein, putative esterase/lipase, alpha/beta hydrolase family*	V.2
1,9	CMM_1372	*hypothetical membrane protein*	V.2
1,8	CMM_0484 (*nagD*)	*N-acetylglucosamine-6-phosphate deacetylase*	I.1
1,8	CMM_1731	*putative Fe-S cluster assembly protein, ABC transporter*	IV.5
1,8	CMM_0668	*conserved hypothetical protein, putative phosphohydrolase*	V.2
1,8	CMM_1475	*oligopeptide ABC transporter, ATPase*	IV.1
1,8	CMM_2376	*membrane protein*	V.2
1,8	CMM_2735 (*glpX*)	*fructose-1,6-bisphosphatase*	I.1
1,8	CMM_0663	*carboxylesterase, type B*	V.1
1,8	CMM_0745	*hypothetical membrane protein*	V.2
1,8	CMM_0018 (*ftsW1*)	*cell division membrane protein*	II.1
1,8	CMM_1724	*conserved hypothetical protein*	V.2
1,8	CMM_1140	*pyridoxamine-phosphate oxidase*	I.5
1,8	CMM_1609 (*wcmN*)	*undecaprenyl phosphate glycosyl-1-phosphate transferase*	II.2
1,8	CMM_1425	*conserved hypothetical protein*	V.2
1,8	CMM_0014 (*pabA*)	*para-aminobenzoate synthetase, component II*	I.5
1,7	CMM_0741	*conserved membrane protein*	IV.1
1,7	CMM_2101	*hypothetical membrane protein*	V.2
1,7	CMM_1520	*carboxymethylenebutenolidase*	V.1
1,7	CMM_2895	*conserved hypothetical protein*	V.2
1,7	CMM_1468 (*dcpA*)	*peptidyl-dipeptidase*	I.2
1,7	pCM2_0058	*hypothetical protein*	V.2
1,7	CMM_0237	*hypothetical protein*	V.2
1,7	CMM_0210	*putative protein chain release factor B*	III.3
1,7	CMM_2737	*peptide ABC transporter, ATPase*	IV.1
1,7	CMM_1442	*thioredoxin*	IV.5
1,7	CMM_2119	*hypothetical membrane protein*	V.2
1,7	CMM_1151	*conserved secreted protein*	V.2
1,7	CMM_1275	*aminotransferase*	I.2
1,6	pCM2_0037	*conserved hypothetical protein*	V.2
1,6	CMM_1238	*conserved membrane protein*	V.2
1,6	CMM_0013	*sortase*	II.2
1,6	CMM_1024 (*wcqM*)	*conserved membrane protein*	II.2
1,6	CMM_0873 (*metB*)	*cystathionine gamma-synthase*	I.2
1,6	CMM_0284	*hypothetical secreted protein*	V.2

Fortsetzung Tabelle 27: Höhere Transkriptmengen in M9-Medium als in TBY-Medium.

1,6	CMM_2834	*aldo/keto reductase*	V.1
1,6	CMM_0652 (*qorA*)	*Zn-dependent quinone oxidoreductase*	I.1
1,6	CMM_0502	*serine protease, family S53*	IV.7
1,6	CMM_0332	*organic acid CoA ligase*	I.6
1,6	CMM_1423	*sulfite oxidase*	I.2
1,6	CMM_2922	*putative dienelactone hydrolase*	V.2
1,6	CMM_1398	*glycosidase*	I.1
1,6	CMM_1512	*efflux MFS permease*	IV.1
1,6	CMM_1896	*bifunctional glycerophosphoryl diester phosphodiesterase/inositol monophosphatase*	I.1
1,6	CMM_0187	*transcriptional regulator, TetR family*	IV.3
1,6	CMM_2472	*hypothetical membrane protein*	V.2
1,6	CMM_1254	*ATPase*	V.1
1,6	CMM_1881	*ATPase*	II.1
1,6	CMM_1729	*2Fe-2S ferredoxin*	IV.5
1,6	CMM_2029 (*pgsA*)	*phosphatidylglycerophosphate synthas*	I.4
1,6	pCM2_PSEUDO_0002	*pCM2_PSEUDO_0002*	V.2
1,6	CMM_1615	*conserved hypothetical protein*	V.2
1,6	CMM_2561 (*guaB2*)	*inosine-5'-monophosphate dehydrogenase*	I.3
1,6	CMM_2090	*short chain dehydrogenase/oxidoreductase*	V.1
1,6	CMM_1022 (*wcqK*)	*secreted protein*	II.2
1,5	CMM_1677	*conserved hypothetical protein*	V.2
1,5	CMM_1622 (*ahpE*)	*thiol-specific antioxidant protein*	IV.5
1,5	CMM_0084	*sugar ABC transporter, permease component*	IV.1
1,5	CMM_1389	*conserved secreted protein*	V.2
1,5	CMM_1185	*ATP-binding protein*	V.1
1,5	CMM_2517	*transcriptional regulator, DeoR family*	IV.3
1,5	CMM_0908	*tyrosine-protein kinase*	IV.3
1,5	CMM_2349 (*fecB1*)	*Fe3+-siderophore ABC transporter, substrate-binding protein*	IV.1
1,5	CMM_0320	*hypothetical protein*	V.2
1,5	CMM_1737 (*zwfA2*)	*glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase*	I.1
1,5	pCM2_0018	*conserved hypothetical protein, ATPase*	IV.2
1,5	CMM_0463	*acetyltransferase*	V.1
1,5	CMM_2968 (*trxA*)	*thioredoxin reductase*	IV.5
1,5	CMM_1513	*Zn-dependent oxidoreductase*	V.1
1,5	CMM_2827	*transcriptional regulator, GntR family*	IV.3
1,5	CMM_1059	*two-component system, sensor kinase*	IV.3
1,5	CMM_0536	*transcriptional regulator, MarR family*	IV.3
1,5	CMM_2138	*conserved secreted protein*	V.2
1,5	CMM_0399	*conserved hypothetical protein*	V.2
1,5	CMM_0914	*flavin-dependent oxidoreductase/monooxygenase*	V.1
1,5	CMM_0093	*transport protein, RND family*	IV.1
1,5	CMM_1730	*putative Fe-S cluster assembly protein, ABC transporter*	IV.5
1,5	CMM_0285	*permease, DMT family*	IV.1
1,5	CMM_2879	*conserved membrane protein*	V.2
1,5	CMM_0510	*hypothetical protein*	V.2
1,5	CMM_1390	*Na+/H+ antiporter, CPA1 family*	IV.1
1,5	CMM_1299	*xylulose kinase*	I.1
1,5	CMM_1134	*arginase*	I.2
1,5	CMM_0132	*conserved secreted protein*	V.2
1,5	CMM_1085 (*otsA*)	*trehalose-phosphate synthase*	I.1
1,5	CMM_1247 (*sipX*)	*signal peptidase I*	IV.2
1,5	CMM_1944	*hypothetical membrane protein*	V.2
1,5	CMM_2836	*permease, DMT family*	IV.1
1,5	CMM_2213	*conserved hypothetical protein, universal stress protein*	IV.4
1,4	CMM_1046	*conserved secreted protein*	V.2
1,4	CMM_0526	*hypothetical protein*	V.2
1,4	CMM_2208	*hypothetical protein*	V.2
1,4	CMM_1623	*membrane protein*	V.2
1,4	CMM_PS_09	*CMM_PS_09*	V.2
1,4	CMM_1025 (*wzy4*)	*conserved membrane protein, putative polysaccharide polymerase*	II.2
1,4	CMM_2059	*hypothetical secreted protein*	V.2
1,4	CMM_1032	*conserved hypothetical protein*	V.2
1,4	CMM_0524	*conserved membrane protein*	V.2

Fortsetzung Tabelle 27: Höhere Transkriptmengen in M9-Medium als in TBY-Medium.

1,4	CMM_0907 (*tdkA*)	*thymidine kinase*	I.3
1,4	CMM_0403 (*glpT*)	*glycerol-3-phosphate MFS permease*	IV.1
1,4	CMM_0391	*hypothetical secreted protein*	V.2
1,4	CMM_1467 (*clpX*)	*ATP-dependent Clp protease, ATP-binding subunit clpX*	IV.4
1,4	CMM_1364	*lyase*	IV.5
1,4	CMM_1538	*acetyltransferase*	V.1
1,4	CMM_0739	*acetyltransferase*	V.1
1,4	CMM_0447	*conserved hypothetical protein*	V.2
1,4	CMM_1188	*conserved membrane protein*	V.2
1,4	CMM_0307	*sulfurtransferase*	I.2
1,4	CMM_0624 (*npsC*)	*non-ribosomal peptide synthase*	I.6
1,4	CMM_2305	*multidrug efflux MFS permease*	IV.1
1,4	CMM_1733 (*ctaB*)	*protoheme IX farnesyltransferase (heme O synthase)*	I.5
1,4	CMM_0206	*3-hydroxyacyl-Coenzyme A dehydrogenase*	I.5
1,4	CMM_2388	*conserved membrane protein*	V.2
1,4	CMM_1298	*conserved membrane protein*	V.2
1,4	CMM_1549	*conserved membrane protein, putatively involved in DNA uptake*	IV.1
1,4	CMM_1543 (*cydD*)	*ABC transporter, ATPase involved in cytochrome bd biosynthesis*	IV.1
1,4	CMM_0669	*hypothetical secreted protein*	V.2
1,4	CMM_0291	*conserved membrane protein, putative anti-sigma factor*	IV.3
1,4	CMM_0825 (*wcoG*)	*cell surface protein*	II.2
1,4	CMM_1963 (*clvG*)	*conserved membrane protein, putative ABC transporter, permease component*	IV.1
1,4	CMM_1440 (*ornA*)	*oligoribonuclease*	III.2
1,4	CMM_2933	*conserved membrane protein, putative copper export protein*	IV.1
1,4	CMM_0326	*methyltransferase*	V.1
1,4	CMM_1476	*oligopeptide ABC transporter, permease component*	IV.1
1,4	CMM_0767	*hypothetical secreted protein*	V.2
1,4	CMM_2754 (*kdpD*)	*two-component system, sensor kinase*	IV.3
1,4	CMM_0258	*conserved secreted protein*	V.2
1,3	CMM_2095B	*hypothetical protein*	V.2
1,3	CMM_1962 (*clvE*)	*conserved membrane protein, putative ABC transporter, permease component*	IV.1
1,3	CMM_1305	*conserved hypothetical protein*	IV.2
1,3	CMM_0222	*multidrug resistance membrane protein*	IV.1
1,3	CMM_1809 (*relA*)	*GTP pyrophosphokinase*	IV.3
1,3	CMM_1754	*phosphotransferase system, fructose-specific IIA component*	IV.1
1,3	CMM_1329	*conserved hypothetical protein*	V.2
1,3	CMM_2767	*hypothetical membrane protein*	V.2
1,3	CMM_2205	*acetyltransferase, GNAT family*	V.1
1,3	CMM_1570	*conserved membrane protein*	V.2
1,3	pCM2_0067	*hypothetical protein*	V.2
1,3	CMM_1904	*conserved hypothetical protein*	V.2
1,3	CMM_2316	*putative phosphomutase/lyase*	V.2
1,3	CMM_0529	*hypothetical protein*	V.2
1,3	CMM_1187	*Mg2+ transporter, MgtE family*	IV.1
1,3	CMM_2825	*conserved hypothetical protein, putative nicotinamidase*	V.2
1,3	CMM_1664	*conserved hypothetical protein*	V.2
1,3	CMM_2924	*hypothetical membrane protein*	V.2
1,3	CMM_2605 (*rplE*)	*50S ribosomal protein L5*	III.3
1,3	CMM_0114	*conserved hypothetical protein*	V.2
1,3	CMM_0772	*acetyltransferase*	V.1
1,3	CMM_2681	*conserved hypothetical protein, putative hydrolase*	V.2
1,2	CMM_1353	*membrane-bound protease*	IV.7
1,2	CMM_2352	*conserved hypothetical protein*	V.2
1,2	CMM_1269	*conserved hypothetical protein*	V.2
1,2	CMM_1819	*putatively involved in pyridoxine biosynthesis*	I.5
1,2	CMM_0418	*epoxide hydrolase*	V.1
1,2	CMM_1586 (*dnaG*)	*DNA primase*	III.1
1,2	CMM_2350 (*fecC1*)	*Fe3+-siderophore ABC transporter, permease component*	IV.1
1,2	CMM_0246	*hypothetical protein*	V.2
1,2	CMM_0119	*transcriptional regulator, TetR family*	IV.3
1,2	CMM_0851	*conserved membrane protein*	V.2

Fortsetzung Tabelle 27: Höhere Transkriptmengen in M9-Medium als in TBY-Medium.

1,2	CMM_1506A	*hypothetical protein*	V.2
1,2	CMM_1804 (*rpsD*)	*30S ribosomal protein S4*	III.3
1,2	CMM_0422	*sugar ABC transporter, ATPase*	IV.1
1,2	CMM_2394	*hypothetical membrane protein*	V.2
1,2	CMM_2661	*hypothetical membrane protein*	V.2
1,2	CMM_1427 (*dinB*)	*DNA polymerase IV*	III.1
1,2	CMM_2436	*L-arabinose ABC transporter, permease component*	IV.1
1,2	CMM_1354 (*recG*)	*ATP-dependent DNA helicase*	III.1
1,2	CMM_0017 (*pbpA*)	*penicillin-binding protein*	II.2
1,1	CMM_1403 (*trmU*)	*tRNA-specific 2-thiouridylase*	III.3
1,1	CMM_0029 (*glsA*)	*glutaminase*	I.2
1,1	CMM_1739 (*pglA*)	*6-phosphogluconolactonase*	I.1
1,1	CMM_1181	*O-methyltransferase*	V.1

Tabelle 28: Mittels Microarray-Experiment ermittelte *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*-Gene, deren Transkriptmengen in M9-Medium im Vergleich mit TBY-Medium erniedrigt waren. 432 Gene wurden identifiziert, von denen 216 eine 2- oder mehrfach veränderte Transkriptmenge zeigten. Die Gene wurden nach dem absteigenden FCA-Wert geordnet. FCA: *fold change absolute*, SBP: *substrate-binding protein*.

FCA	Gen-Name	Mögliche Funktion	COG
25,6	CMM_2898 (*aldA*)	*L-alanine dehydrogenase*	I.2
18,0	CMM_2699	*sugar ABC transporter, substrate-binding protein*	IV.1
15,4	CMM_0866	*alpha-glucoside ABC transporter, SBP*	IV.1
14,0	CMM_0867	*alpha-glucoside ABC transporter, permease component*	IV.1
13,7	CMM_2783	*sugar ABC transporter, substrate-binding protein*	IV.1
13,0	CMM_2878	*citrate transporter, CitMHS family*	IV.1
11,4	CMM_0868	*alpha-glucoside ABC transporter, permease component*	IV.1
10,7	CMM_0270	*sugar ABC transporter, substrate-binding protein*	IV.1
10,4	CMM_0944	*sugar ABC transporter, substrate-binding protein*	IV.1
10,3	CMM_1261	*sugar ABC transporter, permease component*	IV.1
9,7	CMM_0273	*trehalose utilization-related protein*	I.1
9,4	CMM_0790	*sugar ABC transporter ATPase*	IV.1
9,2	CMM_2664	*conserved hypothetical protein*	V.2
8,9	CMM_1262	*sugar ABC transporter, substrate-binding protein*	IV.1
8,8	CMM_2108	*sugar ABC transporter, permease component*	IV.1
8,4	CMM_2107	*sugar ABC transporter, permease component*	IV.1
8,4	CMM_2908 (*gntP*)	*gluconate permease, GntP family*	IV.1
7,2	CMM_0317 (*agaA*)	*alpha-galactosidas*	I.1
6,8	CMM_0616	*conserved secreted protein*	V.2
6,8	CMM_0968 (*ptsA*)	*phosphoenolpyruvate--protein phosphatase*	IV.1
6,8	CMM_0725	*esterase*	V.1
6,7	CMM_0879	*sugar ABC transporter, substrate-binding protein*	IV.1
6,6	CMM_0112	*dehydrogenase/oxidoreductase*	V.1
6,6	CMM_0035	*dehydrogenase/oxidoreductase*	V.1
6,5	CMM_0947	*beta-glycosidase*	I.1
6,1	CMM_0553	*sugar MFS-permease*	IV.1
6,0	CMM_1314	*iron ABC transporter, substrate-binding protein*	IV.1
6,0	CMM_0617	*conserved secreted protein, putative copper resistance protein*	IV.5
5,9	CMM_1587	*oligopeptide ABC transporter, substrate-binding protein*	IV.1
5,9	CMM_1598 (*wcmG*)	*membrane-bound acyltranferase*	II.2
5,9	CMM_2782	*sugar ABC transporter, permease component*	IV.1
5,9	CMM_1081	*hypothetical secreted protein*	V.2
5,8	CMM_2234	*hypothetical protein*	V.2
5,7	CMM_0777	*possibly involved in inositol metabolism*	I.1
5,7	CMM_2204	*conserved secreted protein, putative glycosyl hydrolase containing sensor domain*	V.2
5,4	CMM_2184	*peptide ABC transporter, permease component*	IV.1
5,2	CMM_0620	*hypothetical protein*	V.2
5,1	CMM_2650	*cationic amino acid permease, APC family*	IV.1
5,0	CMM_0778	*acetolactate synthase*	I.2
5,0	CMM_0977	*sugar ABC transporter, ATPase*	IV.1

Fortsetzung Tabelle 28: Niedrigere Transkriptmengen in M9-Medium als in TBY-Medium.

5,0	CMM_1078	*transcriptional regulator, TetR family*	IV.3
5,0	CMM_1877	*long-chain-fatty-acid-CoA ligase*	I.4
5,0	CMM_2077 (*aspA*)	*aspartate ammonia-lyase*	I.2
4,9	CMM_1885 (*dctA*)	*Na+/H+-dicarboxylate symporter, DAACS family*	IV.1
4,8	CMM_2697	*sugar ABC transporter, permease component*	IV.1
4,8	CMM_2779	*carboxylesterase*	V.1
4,7	CMM_0034	*sugar phosphate isomerase/epimerase*	I.1
4,7	CMM_2485	*sugar ABC transporter, ATPase*	IV.1
4,6	CMM_2214	*thiol-disulfide oxidoreductase*	IV.5
4,6	CMM_0793	*myo-inositol dehydrogenase*	I.1
4,5	CMM_1259	*alpha-mannosidase*	I.1
4,5	CMM_1010 (*rmlB*)	*dTDP-glucose 4,6-dehydratase*	II.2
4,4	CMM_2798	*membrane bound metalloendopeptidase, family M23*	IV.7
4,4	CMM_0451	*conserved hypothetical protein*	V.2
4,4	CMM_0978	*sugar ABC transporter, permease component*	IV.1
4,3	CMM_0882 (*xylA*)	*xylose isomerase*	I.1
4,3	CMM_0945	*sugar ABC transporter, permease component*	IV.1
4,2	CMM_0271	*sugar ABC transporter, permease component*	IV.1
4,1	CMM_0554	*hydrolase*	V.1
4,1	CMM_2820	*transcriptional regulator, Cro/CI family*	IV.3
4,1	CMM_1260	*sugar ABC transporter, permease component*	IV.1
4,0	CMM_1009 (*rmlD*)	*dTDP-4-dehydrorhamnose reductase*	II.2
3,9	CMM_2233 (*fumC*)	*fumarate hydratase*	I.1
3,9	CMM_2541	*ABC transporter, fused permease and ATPase*	IV.1
3,8	CMM_0791	*sugar ABC transporter, permease component*	IV.1
3,8	CMM_0884	*acetyltransferase*	V.1
3,8	CMM_0878 (*araA*)	*L-arabinose isomerase*	I.1
3,8	CMM_0865	*transcriptional regulator, LacI family*	IV.3
3,7	CMM_2916	*hypothetical protein*	V.2
3,7	CMM_1831 (*glpK*)	*glycerol kinase*	IV.1
3,7	CMM_2897	*hypothetical membrane protein*	V.2
3,7	CMM_2531	*sugar MFS-permease*	IV.1
3,7	CMM_1245	*sugar ABC transporter, permease component*	IV.1
3,7	CMM_0922 (*acsA1*)	*acetyl-coenzyme A synthetase*	I.4
3,7	CMM_0247	*oxidoreductase/dehydrogenase*	V.1
3,6	CMM_2505 (*pstS*)	*phosphate ABC transporter, substrate-binding protein*	IV.1
3,6	CMM_0100 (*bglF*)	*beta-glucosidase, glycosyl hydrolase family 3*	I.1
3,4	CMM_2770	*putative sugar phosphate isomerase/epimerase*	I.1
3,4	CMM_2781	*sugar ABC transporter, permease component*	IV.1
3,4	CMM_0981 (*deoA*)	*thymidine phosphorylase*	I.3
3,4	CMM_0671	*conserved membrane protein*	V.2
3,4	CMM_0776	*NAD-dependent aldehyde dehydrogenase*	V.1
3,3	CMM_0976	*ABC transporter, substrate-binding protein*	IV.1
3,3	CMM_0101 (*bglG*)	*beta-glucosidase, glycosyl hydrolase family 1*	I.1
3,2	CMM_1457 (*pepN*)	*aminopeptidase N*	I.2
3,2	CMM_0272	*sugar ABC transporter, permease component*	IV.1
3,2	CMM_0980 (*cddA*)	*cytidine deaminase*	I.3
3,2	CMM_2802	*conserved hypothetical protein*	V.2
3,2	CMM_1792 (*nusB*)	*N utilization substance protein B homolog*	III.2
3,2	CMM_1588	*oligopeptide ABC transporter, permease component*	IV.1
3,2	CMM_0881	*sugar ABC transporter, permease component*	IV.1
3,2	CMM_0880	*sugar ABC transporter, ATPase*	IV.1
3,2	CMM_0450	*oxidoreductase*	V.1
3,1	CMM_1080	*conserved membrane protein*	IV.1
3,1	CMM_0086	*sugar ABC transporter, substrate-binding protein*	IV.1
3,1	CMM_0201	*glycosyl hydrolase, family 2*	I.1
3,0	CMM_0971 (*sdhD*)	*succinate dehydrogenase, hydrophobic membrane subunit*	I.1
3,0	CMM_0883 (*bglJ*)	*beta-glucosidase*	I.1
3,0	CMM_1651	*topoisomerase II, subunit A*	III.1
3,0	CMM_0690	*hypothetical protein*	V.2
2,9	CMM_1816 (*ruvC*)	*crossover junction endodeoxyribonuclease*	III.1
2,9	CMM_2171 (*gltA2*)	*citrate synthase*	I.1
2,9	CMM_0970	*succinate dehydrogenase flavoprotein subunit*	I.1
2,9	CMM_2527	*oxidoreductase*	V.1
2,9	CMM_1244	*sugar ABC transporter, ATPase*	IV.1

Fortsetzung Tabelle 28: Niedrigere Transkriptmengen in M9-Medium als in TBY-Medium.

2,9	CMM_1453 (*tesB*)	*acyl-CoA thioesterase II*	I.4
2,9	CMM_1701	*glycine/betaine/carnitin ABC transporter ATPase*	IV.1
2,9	CMM_2379 (*prpB*)	*methylisocitrate lyase/phosphonomutase*	I.1
2,9	CMM_2788 (*nusG*)	*transcription antitermination protein*	III.2
2,9	CMM_1851	*pseudouridine synthase*	III.3
2,9	CMM_0840	*NPL/P60 family secreted protein*	IV.6
2,8	CMM_1377	*conserved hypothetical protein, putative endonuclease*	III.1
2,8	CMM_0982 (*iunH*)	*inosine-uridine preferring nucleoside hydrolase*	I.3
2,8	CMM_0815	*transcriptional regulator, CopG family*	IV.3
2,8	CMM_0321	*oxidoreductase*	V.1
2,8	CMM_1171	*conserved hypothetical protein*	V.2
2,8	CMM_2542	*ABC transporter, fused permease and ATPase*	IV.1
2,8	CMM_0972 (*sdhC*)	*succinate dehydrogenase, cytochrome b subunit*	I.1
2,7	CMM_2181	*peptide ABC transporter, ATPase*	IV.1
2,7	CMM_1793 (*efpA*)	*elongation factor P (EF-P)*	III.3
2,7	CMM_0353	*sugar ABC transporter, permease component*	IV.1
2,7	CMM_1565 (*dnaJ2*)	*chaperone*	IV.4
2,7	CMM_2823	*conserved membrane protein*	V.2
2,7	CMM_2793	*conserved hypothetical protein, putative acyl dehydratase*	V.2
2,7	CMM_1008 (*wzm*)	*polysaccharide ABC-transporter, permease component*	IV.1
2,7	CMM_1472 (*valS*)	*valyl-tRNA synthetase*	III.3
2,6	CMM_1817	*conserved hypothetical protein*	V.2
2,6	CMM_0197	*sugar ABC transporter, permease component*	IV.1
2,6	CMM_1473 (*pckA*)	*phosphoenolpyruvate carboxykinase*	I.1
2,6	CMM_0383 (*ppcA*)	*phosphoenolpyruvate carboxylase*	I.1
2,6	CMM_2148 (*rbfA*)	*ribosome-binding factor A*	III.3
2,6	CMM_2578	*phosphoglucosamine mutase*	I.1
2,6	CMM_1818	*glutamine amidotransferase, subunit pdxT*	I.5
2,6	CMM_0367 (*phnD*)	*phosphonate ABC transporter, SBP*	IV.1
2,5	CMM_2371 (*gltA1*)	*citrate synthase*	I.1
2,5	CMM_2792	*conserved hypothetical protein, putative acyl dehydratase*	V.2
2,5	CMM_2484	*putative protein-disulfide isomerase*	IV.4
2,5	CMM_2976	*conserved hypothetical protein*	V.2
2,5	CMM_2291	*endonuclease*	III.1
2,5	CMM_0296	*sugar ABC transporter, substrate-binding protein*	IV.1
2,5	pCM2_0059	*conserved hypothetical protein*	V.2
2,5	CMM_1448	*hypothetical protein*	V.2
2,5	CMM_1620	*transcriptional regulator, CdaR family*	IV.3
2,4	CMM_1668	*ATPase*	V.1
2,4	CMM_2244 (*greA*)	*transcription elongation factor*	III.2
2,4	CMM_0520	*conserved hypothetical protein*	V.2
2,4	CMM_0839	*membrane bound metalloprotease*	IV.7
2,4	CMM_2575 (*acpS*)	*holo-[acyl-carrier-protein] synthase*	I.4
2,4	CMM_2452	*transcriptional regulator, Cro/CI family, nucleotidyltransferase*	IV.3
2,4	CMM_1815 (*ruvA*)	*holliday junction ATP-dependent DNA helicase*	III.1
2,4	CMM_2972 (*parA*)	*chromosome partitioning protein*	II.1
2,4	CMM_2777	*putative recombinase/nuclease*	V.2
2,4	CMM_0220	*conserved hypothetical protein*	V.2
2,4	CMM_1689	*transcriptional regulator*	IV.3
2,4	CMM_1111	*conserved hypothetical protein*	V.2
2,4	CMM_0964	*hydrolase*	V.1
2,4	CMM_0227	*acetyl xylan esterase, putative antibiotic deacetylase*	IV.5
2,4	CMM_2453	*conserved hypothetical protein*	V.2
2,3	CMM_0792	*sugar ABC transporter, substrate-binding protein*	IV.1
2,3	CMM_2758	*conserved hypothetical protein*	V.2
2,3	CMM_2925	*conserved hypothetical protein, putative helicase*	V.2
2,3	CMM_1506	*short chain dehydrogenase/oxidoreductase*	V.1
2,3	CMM_1282	*CDP-glycerol:poly(Glycerophosphate) glycerophosphotransferase*	II.2
2,3	CMM_1156	*transcription termination factor*	III.2
2,3	CMM_0521	*oxidoreductase/dehydrogenase*	V.1
2,3	CMM_0361	*sugar ABC transporter, permease component*	IV.1
2,3	CMM_2109 (*lacZ*)	*beta-galactosidase*	I.1
2,3	CMM_2268 (*mfdA*)	*transcription-repair coupling factor*	III.2
2,3	CMM_2665	*putative sugar phosphate isomerase/epimerase*	V.2

Fortsetzung Tabelle 28: Niedrigere Transkriptmengen in M9-Medium als in TBY-Medium.

2,2	CMM_0969 (*sdhB*)	*succinate dehydrogenase, iron-sulfur protein*	I.1
2,2	CMM_0420	*sugar ABC transporter, permease component*	IV.1
2,2	CMM_2417	*aldo/keto reductase*	V.1
2,2	CMM_2356	*oxidoreductase*	V.1
2,2	CMM_0689 (*purA*)	*adenylosuccinate synthetase*	I.3
2,2	CMM_2519 (*galK*)	*galactokinase*	I.1
2,2	CMM_1407 (*gatC*)	*glutamyl-tRNA(Gln) amidotransferase, subunit C*	III.3
2,2	CMM_0555	*conserved hypothetical protein, SGNH_hydrolase subfamily*	V.2
2,2	CMM_2833	*MFS permease*	IV.1
2,2	CMM_2308	*conserved membrane protein, putatively involved in polysaccharide biosynthesis*	V.2
2,2	CMM_2188	*conserved membrane protein, putative transporter, SSS family*	IV.1
2,2	CMM_0794	*sugar epimerase*	I.1
2,2	CMM_1911	*dehydrogenase*	V.1
2,2	CMM_0102 (*bglH*)	*beta-galactosidase*	I.1
2,2	CMM_2441	*conserved membrane protein*	V.2
2,1	CMM_0248	*conserved membrane protein*	V.2
2,1	CMM_1218	*conserved hypothetical protein, putative arsenate reductase*	IV.5
2,1	CMM_2223	*GTP-binding protein, obg family*	III.3
2,1	CMM_1385 (*pyrH*)	*uridylate kinase*	I.3
2,1	CMM_2977 (*rnpA*)	*ribonuclease P, protein component*	III.2
2,1	CMM_0457	*transcriptional regulator, TetR family*	IV.3
2,1	CMM_2663	*oxidoreductase*	V.1
2,1	CMM_2867	*transcriptional regulator, MarR family*	IV.3
2,1	CMM_1590	*oligopeptide ABC transporter, ATPase*	IV.1
2,1	CMM_1692	*phosphatase, HAD hydrolase family*	V.1
2,1	CMM_2310	*glycosyltransferase*	II.2
2,1	CMM_0322	*dipeptidase*	I.2
2,1	CMM_0007 (*gyrA*)	*DNA gyrase, subunit A*	III.1
2,1	CMM_2956	*transcriptional regulator*	IV.3
2,1	CMM_0619 (*putA*)	*delta-1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase /proline oxidase*	I.2
2,0	CMM_2518 (*galT*)	*galactose-1-phosphate uridylyltransferase*	I.1
2,0	CMM_2548 (*sucC*)	*succinyl-CoA ligase [ADP-forming], subunit beta*	I.1
2,0	CMM_2698	*sugar ABC transporter, permease component*	IV.1
2,0	CMM_1027 (*manA*)	*mannose-6-phosphate isomerase*	II.2
2,0	CMM_1487	*ribonuclease*	III.2
2,0	CMM_0002 (*dnaN*)	*DNA polymerase III, beta chain*	III.1
2,0	CMM_1874 (*aroG*)	*phospho-2-dehydro-3-deoxyheptonate aldolase*	I.2
2,0	CMM_0362	*alpha glucosidase*	I.1
2,0	CMM_0877 (*araD*)	*L-ribulose-5-phosphate 4-epimerase*	I.1
2,0	CMM_PS_20	*CMM_PS_20*	V.2
2,0	CMM_1157 (*prfA*)	*peptide chain release factor 1 (RF-1)*	III.3
2,0	CMM_0040	*hypothetical protein*	V.2
2,0	CMM_0088 (*bglA*)	*beta-glucosidase*	I.1
2,0	CMM_0961 (*ribAB*)	*3,4-dihydroxy-2-butanone 4-phosphate synthase/GTP cyclohydrolase II*	I.5
2,0	CMM_2797 (*aglC*)	*alpha-glucosidase, glycosyl hydrolase family 13*	I.1
2,0	CMM_1654	*conserved hypothetical protein*	V.2
2,0	CMM_0066 (*parX*)	*partitioning protein*	II.1
1,9	CMM_0337	*conserved secreted protein, putative carboxypeptidase or PBP*	V.2
1,9	CMM_0587 (*hemE*)	*uroporphyrinogen decarboxylase*	I.5
1,9	CMM_0788 (*dakA*)	*dihydroxyacetone kinase*	I.1
1,9	CMM_0654 (*cysE*)	*serine O-acetyltransferase*	I.2
1,9	CMM_0592	*conserved membrane protein*	I.5
1,9	CMM_2180	*peptide ABC transporter, substrate-binding protein*	IV.1
1,9	CMM_1719 (*glgC*)	*glucose-1-phosphate adenylyltransferase*	I.1
1,9	CMM_0585	*acetyltransferase*	V.1
1,9	CMM_0004 (*recF*)	*DNA replication and repair protein*	III.1
1,9	CMM_1567	*hydrolase, HIT family*	V.1
1,9	CMM_1820	*conserved hypothetical protein, HIT family hydrolase*	V.2
1,9	CMM_2829	*transcriptional regulator*	IV.3
1,9	CMM_0730 (*purS*)	*phosphoribosylformylglycinamidine (FGAM) synthase*	I.3

Fortsetzung Tabelle 28: Niedrigere Transkriptmengen in M9-Medium als in TBY-Medium.

1,9	CMM_2427	*acetyltransferase*	V.1
1,9	CMM_2245 (*ilvA*)	*threonine dehydratase*	I.2
1,8	CMM_1012 (*rmlC*)	*dTDP-4-dehydrorhamnose 3,5-epimerase*	II.2
1,8	CMM_2269 (*pthA*)	*peptidyl-tRNA hydrolase*	III.3
1,8	CMM_1802 (*alaS*)	*alanyl-tRNA synthetase*	III.3
1,8	CMM_0975	*ABC transporter, substrate-binding protein*	IV.1
1,8	CMM_0655	*RNA methyltransferase*	III.3
1,8	CMM_2906	*transcriptional regulator, GntR family*	IV.3
1,8	CMM_2920	*aminopeptidase, M18 family*	IV.7
1,8	CMM_2950 (*purB*)	*adenylosuccinate lyase*	I.3
1,8	CMM_1659 (*acnA*)	*aconitate hydratase*	I.1
1,8	CMM_0423	*sugar ABC transporter, substrate-binding protein*	IV.1
1,8	CMM_2426 (*sseB*)	*thiosulfate sulfurtransferase*	I.2
1,8	CMM_2440	*conserved hypothetical protein*	V.2
1,8	CMM_0097 (*bglD*)	*beta-glucosidase, glycosyl hydrolase family 3*	I.1
1,8	CMM_1180	*conserved hypothetical protein*	V.2
1,8	CMM_0729 (*purQ*)	*phosphoribosylformylglycinamidine synthase I*	I.3
1,8	CMM_0757 (*purF*)	*amidophosphoribosyltransferase*	I.3
1,8	CMM_2747	*transcriptional regulator, Cro/CI family*	IV.3
1,8	CMM_2492	*two-component system, response regulator*	IV.3
1,8	CMM_1003 (*purK*)	*phosphoribosylaminoimidazole carboxylase, ATPase subunit*	I.3
1,8	CMM_0413	*hypothetical protein*	V.2
1,8	CMM_2780	*sugar hydrolase*	V.1
1,8	CMM_2515	*hypothetical protein*	V.2
1,8	CMM_2506 (*pstC*)	*phosphate ABC transporter, permease component*	IV.1
1,8	CMM_1070	*transcriptional regulator, MarR family*	IV.3
1,8	CMM_1054 (*secA*)	*protein translocase subunit SecA*	IV.2
1,7	CMM_0853 (*panC*)	*pantoate-beta-alanine ligase (EC 6.3.2.1)*	I.5
1,7	CMM_0795	*extracellular nuclease/phosphatase*	IV.6
1,7	CMM_PS_22	*CMM_PS_22*	V.2
1,7	CMM_2494 (*phoU*)	*phosphate transport system regulator*	IV.3
1,7	CMM_0946	*sugar ABC transporter, permease component*	IV.1
1,7	CMM_0545 (*trkA*)	*potassium uptake system NAD-binding protein*	IV.1
1,7	CMM_2865	*conserved hypothetical protein, putative nuclease*	V.2
1,7	CMM_1693	*conserved hypothetical protein*	V.2
1,7	CMM_0532 (*panD*)	*aspartate 1-decarboxylase*	I.5
1,7	CMM_1015 (*wcqE*)	*glycosyltransferase*	II.2
1,7	CMM_2380 (*prpD*)	*2-methylcitrate dehydratase*	I.1
1,7	CMM_1979	*conserved hypothetical protein, DNA-binding*	V.2
1,7	CMM_1720 (*serB2*)	*phosphoserine phosphatase*	I.2
1,7	CMM_1704	*DNA or RNA helicase*	III.1
1,7	CMM_1203	*serine protease, ATP-dependent, family S16*	IV.7
1,7	CMM_0393	*conserved hypothetical protein*	V.2
1,7	CMM_2520	*acetyltransferase/siderophore binding protein*	V.1
1,7	CMM_1676	*putative pseudogene homologous to C-terminus of XysB*	V.2
1,7	CMM_1387 (*cdsA*)	*phosphatidate cytidylyltransferase*	I.3
1,7	CMM_2381	*duplicated acetyltransferase*	V.1
1,7	CMM_1838	*rRNA methylase involved in antibiotic resistance*	III.3
1,7	CMM_2899	*leucine-responsive regulatory protein, AsnC family*	IV.3
1,7	CMM_2791 (*murB*)	*UDP-N-acetylmuramate dehydrogenase*	II.2
1,7	CMM_1330	*MFS permease*	IV.1
1,7	pCM2_0033 (*parA*)	*ATPase, partitioning protein*	II.1
1,7	CMM_1550 (*holA*)	*DNA polymerase III, delta subunit*	III.1
1,7	CMM_1844	*metallopeptidase, family M20A*	IV.7
1,7	CMM_0026	*conserved hypothetical protein, putative GTPase*	V.2
1,6	CMM_2677	*transcriptional regulator, TetR family*	IV.3
1,6	CMM_1014 (*wcqD*)	*NDP-sugar-epimerase*	II.2
1,6	CMM_0965 (*trpS*)	*tryptophanyl-tRNA synthetase*	III.3
1,6	CMM_1560	*phosphatase, HAD hydrolase family*	V.1
1,6	CMM_2003 (*pheS*)	*phenylalanyl-tRNA synthetase, alpha subunit*	III.3
1,6	CMM_2413	*glucarate dehydratase*	I.1
1,6	CMM_1097	*membrane protein*	V.2
1,6	CMM_2591 (*mtlA*)	*PTS system, mannitol-specific IIBC component*	IV.1
1,6	CMM_2015 (*hisH*)	*imidazole glycerol phosphate synthase subunit*	I.2
1,6	CMM_0803 (*bldKE*)	*peptide ABC transporter, ATPase*	IV.1

Fortsetzung Tabelle 28: Niedrigere Transkriptmengen in M9-Medium als in TBY-Medium.

1,6	CMM_0180	*hypothetical protein*	V.2
1,6	CMM_1386 (*frrA*)	*ribosome-recycling factor (RRF) (ribosome-releasing factor)*	III.3
1,6	CMM_0308	*conserved hypothetical protein, putative AAA ATPase*	V.2
1,6	CMM_1873 (*pknE*)	*serine/threonine protein kinase, eukaryotic-type*	IV.3
1,6	CMM_2052	*ATP-dependent DNA helicase*	III.1
1,6	CMM_1864 (*murE*)	*UDP-N-acetylmuramoylalanyl-D-glutamate-2,6-diamino-pimelate ligase*	II.2
1,6	CMM_1496	*conserved hypothetical protein*	V.2
1,6	CMM_2203	*conserved hypothetical protein*	V.2
1,6	CMM_0472	*hypothetical protein*	V.2
1,6	CMM_2110	*sugar alcohol dehydrogenase*	V.1
1,6	CMM_0988 (*manB*)	*phosphomannomutase*	I.1
1,6	CMM_2491	*conserved secreted protein*	V.2
1,6	CMM_2014 (*hisA*)	*phosphoribosylformimino-5-aminoimidazole carboxamide riboucleotide isomerase*	I.2
1,6	CMM_2821	*hypothetical protein*	V.2
1,6	CMM_0672	*conserved hypothetical protein, putative ATPase*	V.2
1,6	CMM_2964 (*pcnA*)	*RNA nucleotidyltransferase*	III.3
1,6	CMM_0305	*acetyltransferase*	V.1
1,5	CMM_1030 (*wcqR*)	*glycosyltransferase*	II.2
1,5	CMM_2635	*conserved hypothetical protein*	V.2
1,5	CMM_2013	*conserved hypothetical protein*	V.2
1,5	CMM_1909 (*cpsY*)	*UDP-glucose 4-epimerase*	I.1
1,5	CMM_1992	*hypothetical membrane protein*	V.2
1,5	CMM_0069 (*nhaA1*)	*Na(+)/H(+) antiporter*	IV.1
1,5	CMM_0561 (*aspS*)	*aspartyl-tRNA synthetase*	III.3
1,5	CMM_0869	*ABC transporter, fused permease and ATPase domains*	IV.1
1,5	CMM_2822	*xanthine/uracil family permease, NCS2 family*	IV.1
1,5	CMM_1460 (*mutM*)	*DNA glycosylase*	III.1
1,5	CMM_2874	*putative RNA-binding regulator*	V.2
1,5	CMM_1646 (*sigA*)	*RNA polymerase sigma factor*	IV.3
1,5	CMM_2264 (*hisS*)	*histidyl-tRNA synthetase*	III.3
1,5	CMM_2078	*conserved hypothetical protein, putative nuclease*	V.2
1,5	CMM_2888 (*crtE*)	*geranylgeranyl pyrophosphate synthase*	I.6
1,5	CMM_2189	*transcriptional regulator, RpiR family*	IV.3
1,5	CMM_2768	*conserved membrane protein, TerC family*	IV.1
1,5	CMM_1796 (*aroB*)	*3-dehydroquinate synthase*	I.2
1,5	CMM_1803	*hypothetical secreted protein*	V.2
1,5	CMM_2329	*conserved hypothetical protein*	V.2
1,5	CMM_1199	*NTP pyrophosphohydrolase*	III.1
1,5	CMM_0511	*conserved secreted protein*	V.2
1,5	CMM_2883	*hypothetical protein*	V.2
1,5	CMM_0909	*hypothetical secreted protein*	V.2
1,5	CMM_2451	*conserved hypothetical protein, putative helicase*	V.2
1,5	CMM_1213	*conserved membrane protein*	V.2
1,5	CMM_2338	*SAM-dependent methyltransferase*	V.1
1,5	CMM_2151 (*nusA*)	*transcriptional termination/antitermination factor*	III.2
1,5	CMM_2034	*hydrolase, metallo-beta-lactamase superfamily*	IV.5
1,5	CMM_0198	*sugar ABC transporter, permease component*	IV.1
1,5	CMM_0380 (*phnG*)	*C-P (carbon-phosphorus) lyase component*	I.6
1,5	CMM_1566	*rRNA methyltransferase*	III.3
1,5	CMM_2173 (*fdxB*)	*ferredoxin*	I.1
1,4	CMM_1682 (*glpQ2*)	*glycerophosphoryl diester phosphodiesterase*	I.4
1,4	CMM_2075	*hydrolase*	V.1
1,4	CMM_0962 (*ribC*)	*riboflavin synthase, alpha chain*	I.5
1,4	CMM_0126	*conserved hypothetical protein, putative anti-sigma factor*	IV.3
1,4	CMM_0261	*acetyltransferase*	V.1
1,4	CMM_0006 (*gyrB*)	*DNA gyrase, subunit B*	III.1
1,4	CMM_0605	*kinase*	I.5
1,4	CMM_2418 (*fadD*)	*long-chain-fatty-acid-CoA ligase*	I.4
1,4	CMM_0921	*endoribonuclease, translation initiation inhibitor*	III.3
1,4	CMM_0789	*transcriptional regulator, GntR family*	IV.3
1,4	CMM_0602	*conserved membrane protein*	V.2
1,4	CMM_1997 (*argF*)	*ornithine carbamoyltransferase*	I.2
1,4	CMM_2106	*sugar ABC transporter, substrate-binding protein*	IV.1

Fortsetzung Tabelle 28: Niedrigere Transkriptmengen in M9-Medium als in TBY-Medium.

1,4	CMM_2731	*sugar ABC transporter, permease component*	IV.1
1,4	CMM_0323	*acetyltransferase, GNAT family*	V.1
1,4	CMM_2800	*conserved membrane protein*	V.2
1,4	CMM_1452	*thioesterase*	I.4
1,4	CMM_1103	*hypothetical membrane protein*	V.2
1,4	CMM_2965	*conserved secreted protein*	V.2
1,4	CMM_1327	*conserved hypothetical protein, putative carbohydrate kinase*	V.2
1,4	CMM_1138	*conserved hypothetical protein*	V.2
1,4	CMM_1178 (*dapE*)	*succinyl-diaminopimelate desuccinylase*	I.2
1,4	CMM_0775	*conserved hypothetical protein, putative aldolase*	I.1
1,4	CMM_1306	*secreted protein*	IV.2
1,4	CMM_1671	*transcriptional regulator, MarR family*	IV.3
1,4	CMM_2666	*multidrug ABC transporter, fused permease and ATPase*	IV.1
1,4	CMM_2194	*hydrolase/phosphatase*	V.1
1,4	CMM_1652	*conserved hypothetical protein, putative phosphodiesterase*	V.2
1,4	CMM_1857 (*ftsQ*)	*cell division protein*	II.1
1,4	CMM_0449	*hypothetical protein*	V.2
1,4	CMM_1827	*PTS system hybrid protein*	IV.1
1,4	CMM_0810 (*dapX*)	*dihydrodipicolinate synthase*	I.2
1,4	CMM_0081	*short chain dehydrogenase/reductase*	V.1
1,4	CMM_1859 (*murG*)	*UDP-N-acetylglucosamine-N-acetylmuramyl-(pentapeptide) pyrophosphoryl-undecaprenol N-acetylglucosamine transferase*	II.2
1,4	CMM_0760	*FAD-dependent oxidoreductase*	V.1
1,4	CMM_0139	*conserved hypothetical protein, putative NUDIX hydrolase*	III.1
1,4	CMM_2355	*transcriptional regulator, LacI family*	IV.3
1,3	CMM_0016 (*pknA*)	*serine/threonine protein kinase*	IV.3
1,3	CMM_2395 (*aglB*)	*alpha glycosidase*	I.1
1,3	CMM_1833 (*trpD*)	*anthranilate phosphoribosyltransferase*	I.2
1,3	CMM_2147 (*mutY*)	*A/G-specific adenine glycosylase*	III.1
1,3	CMM_1148	*conserved hypothetical protein, putative cysteine protease*	IV.7
1,3	CMM_2537 (*icdA*)	*isocitrate dehydrogenase*	I.1
1,3	CMM_0989 (*punA*)	*purine nucleoside phosphorylase*	I.3
1,3	CMM_1777 (*metK*)	*S-adenosylmethionine synthetase*	I.5
1,3	CMM_0312	*acetyltransferase, GNAT family*	V.1
1,3	CMM_2144 (*truB*)	*tRNA pseudouridine synthase B*	III.3
1,3	CMM_0665 (*fdxA*)	*ferredoxin*	I.1
1,3	CMM_1313	*iron ABC transporter, ATPase*	IV.1
1,3	CMM_1660 (*dxsA*)	*1-deoxyxylulose-5-phosphate synthase*	I.1
1,3	CMM_2756	*esterase/lipase*	V.1
1,3	CMM_1133 (*echA*)	*enoyl-CoA hydratase*	I.4
1,3	CMM_1534 (*chsA*)	*chalcone synthase/polyketide synthase III*	I.6
1,3	CMM_0268	*hydroxyacid dehydrogenase*	V.1
1,3	CMM_2969	*transcriptional regulator containing an aminotransferase domain*	IV.3
1,3	CMM_0226	*hypothetical secreted protein*	V.2
1,3	CMM_2230 (*xseB*)	*exonuclease VII, small subunit*	III.1
1,3	CMM_1695 (*bacA*)	*undecaprenyl diphosphatase (bacitracin resistance protein)*	II.2
1,3	CMM_0133	*pyrrolidone-carboxylate peptidase (pyrase)*	IV.7
1,3	CMM_0313	*transcriptional regulator, histone-like protein*	IV.3
1,3	CMM_1421	*conserved hypothetical protein, putative phosphoesterase*	V.2
1,3	CMM_2773	*conserved hypothetical protein, putative nitroreductase*	V.2
1,3	CMM_0580	*conserved hypothetical protein, putative ester cyclase*	V.2
1,3	CMM_0684	*antimicrobial peptide ABC transporter, ATPase*	IV.1
1,2	CMM_0432	*conserved hypothetical protein*	V.2
1,2	CMM_0355 (*bgaA*)	*beta-galactosidase*	I.1
1,2	CMM_0677 (*sbcD*)	*dsDNA exonuclease subunit*	III.1
1,2	CMM_1828	*dihydroxyacetone kinase*	I.1
1,2	CMM_0651	*monooxygenase*	V.1
1,2	CMM_2576 (*glmS*)	*glucosamine-fructose-6-phosphate aminotransferase*	I.1
1,2	CMM_0203	*drug exporter, RND family*	IV.1
1,2	CMM_0080	*conserved hypothetical protein*	V.2
1,2	CMM_1026 (*gcdH*)	*glutaryl-CoA dehydrogenase*	II.2
1,2	CMM_1767 (*trpE1*)	*anthranilate synthase, component I*	I.2
1,2	CMM_0440	*transcriptional regulator*	IV.3

Fortsetzung Tabelle 28: Niedrigere Transkriptmengen in M9-Medium als in TBY-Medium.

1,2	CMM_1640 (*pknD*)	*serine/threonine protein kinase*	IV.3
1,2	CMM_1361 (*smcA*)	*chromosome segregation ATPase*	II.1
1,2	CMM_0515 (*serS*)	*seryl-tRNA synthetase*	III.3
1,2	CMM_2272 (*gndA2*)	*6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating*	I.1
1,2	CMM_0079	*conserved hypothetical protein, putative sulfurtransferase*	V.2
1,1	CMM_0920	*conserved hypothetical protein*	V.2
1,1	CMM_1578 (*recO*)	*DNA repair protein /recombination protein*	III.1
1,1	CMM_2799 (*suhB*)	*inositol-1-monophosphatase*	I.1
1,1	CMM_2226 (*fbaA*)	*fructose-bisphosphate aldolase*	I.1
1,1	CMM_0290 (*sigL*)	*RNA polymerase sigma factor, ECF-subfamily*	IV.3
1,1	CMM_0260 (*crcB2*)	*membrane protein involved in chromosome condensation*	II.1
1,1	CMM_1751 (*coaE*)	*dephospho-CoA kinase*	I.5
1,1	CMM_1098	*membrane protein*	V.2

Tabelle 29: Mittels Microarray-Experiment ermittelte *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*-Gene, deren Transkriptmengen in XMM-Medium + 20 µM Acetosyringon (AS) im Vergleich mit XMM-Medium erhöht waren. 270 Gene wurden identifiziert, von denen 57 eine 2- oder mehrfach erhöhte Transkriptmenge zeigten. Die Gene wurden nach dem absteigenden FCA-Wert geordnet. FCA: *fold change absolute*, SBP: *substrate-binding protein*.

FCA	Gen-Name	Mögliche Funktion	COG
39,5	CMM_2776	*hypothetical protein*	V.2
29,5	CMM_1921	*hypothetical secreted protein*	V.2
29,0	CMM_2775	*conserved hypothetical protein*	V.2
27,9	CMM_2774	*conserved hypothetical protein*	V.2
25,6	CMM_2878	*citrate transporter, CitMHS family*	IV.1
19,0	CMM_2772	*multidrug ABC transporter, ATPase*	IV.1
18,3	CMM_1541 (*cydA*)	*cytochrome bd-type menaquinol oxidase, subunit I*	I.1
14,8	CMM_0732	*MFS permease*	IV.1
14,7	CMM_2898 (*aldA*)	*L-alanine dehydrogenase*	I.2
13,3	CMM_2771	*multidrug ABC transporter, permease component*	IV.1
11,7	CMM_1542 (*cydB*)	*cytochrome bd-type menaquinol oxidase, subunit II*	I.1
11,0	CMM_1249	*hypothetical secreted protein*	V.2
10,7	CMM_0235	*conserved secreted protein, putative bacteriocin*	V.2
10,0	CMM_1138	*conserved hypothetical protein*	V.2
9,2	CMM_0897	*cell surface protein, putative adhesin*	II.2
8,7	CMM_0898	*hypothetical protein*	V.2
7,6	CMM_0630 (rocD)	*ornithine aminotransferase*	I.2
6,8	CMM_0166 (*fhuD*)	*Fe3+-siderophore ABC transporter, substrate-binding protein*	IV.1
5,9	CMM_0928 (*tmkA*)	*thymidylate kinase*	I.3
5,8	CMM_0451	*conserved hypothetical protein*	V.2
5,7	CMM_2931 (*fecB2*)	*iron-siderophore ABC transporter, substrate-binding protein*	IV.1
5,2	CMM_0899	*conserved membrane protein*	V.2
5,1	CMM_0450	*oxidoreductase*	V.1
4,9	CMM_PS_16	*CMM_PS_16*	V.2
4,8	CMM_0629	*amidinotransferase*	I.2
4,8	CMM_2526	*MFS permease*	IV.1
4,0	CMM_2773	*conserved hypothetical protein, putative nitroreductase*	V.2
3,9	CMM_2566 (*livK*)	*branched-chain amino acid ABC transporter, SBP*	IV.1
3,8	CMM_1627	*metal ABC transporter, permease component*	IV.1
3,8	CMM_1920	*conserved hypothetical protein*	V.2
3,8	CMM_1267	*DNA alkylation repair enzyme*	III.1
3,7	CMM_1129	*siderophore-interacting protein*	I.6
3,7	CMM_0234	*hypothetical membrane protein*	V.2
3,6	CMM_2467	*hydrolase*	V.1
3,4	CMM_1998 (*argD*)	*acetylornithine aminotransferase*	I.2.
3,2	CMM_2072	*DNA glycosylase*	III.1
3,0	CMM_2897	*hypothetical membrane protein*	V.2
2,7	CMM_0300	*nucleoside-diphosphate-sugar epimerase*	I.1
2,7	CMM_0167 (*fhuB*)	*Fe3+-siderophore ABC transporter, permease component*	IV.1
2,7	CMM_1089 (*mnhD*)	*multisubunit Na+/H+ antiporter, NADH-quinone dehydrogenase*	IV.1

Fortsetzung Tabelle 29: Höhere Transkriptmengen in XMM-Medium+AS als in XMM-Medium.

2,5	CMM_2941	*metal ABC transporter, substrate-binding protein*	IV.1
2,5	CMM_1713	*hydrolase*	V.1
2,4	CMM_2199	*transcriptional regulator*	IV.3
2,4	CMM_1247 (*sipX*)	*conserved membrane protein, putative pilus assembly protein*	IV.2
2,3	CMM_1799 (*aroE*)	*shikimate 5-dehydrogenase*	I.2
2,3	CMM_1244	*sugar ABC transporter, ATPase*	IV.1
2,3	CMM_0731	*conserved hypothetical protein*	V.2
2,3	CMM_0678 (*pknC*)	*serine/threonine protein kinase*	IV.3
2,2	CMM_2770	*putative sugar phosphate isomerase/epimerase*	I.1
2,2	CMM_1505 (*fruB*)	*phosphotransferase system, phosphocarrier protein HPr*	IV.1
2,2	CMM_1126	*extracellular 5'-nucleotidase*	II.2
2,1	CMM_0967	*conserved membrane protein, putative ribonuclease*	III.2
2,0	CMM_1160	*conserved hypothetical protein*	V.2
2,0	CMM_1426	*conserved hypothetical protein*	V.2
2,0	CMM_1911	*dehydrogenase*	V.1
2,0	CMM_0681 (*fabB*)	*3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase*	I.4
2,0	CMM_2372	*dihydrolipoamide dehydrogenase, (E3) component*	I.1
1,9	CMM_0620	*hypothetical protein*	V.2
1,9	CMM_0557	*hypothetical protein*	V.2
1,9	CMM_1416	*dehydrogenase*	V.1
1,9	CMM_2494 (*phoU*)	*phosphate transport system regulator*	IV.3
1,9	CMM_0449	*hypothetical protein*	V.2
1,9	CMM_2699	*sugar ABC transporter, substrate-binding protein*	IV.1
1,9	CMM_0804 (*pipA*)	*prolyl aminopeptidase*	I.2
1,9	CMM_0725	*esterase*	V.1
1,9	CMM_1626	*metal ABC transporter, ATPase*	IV.1
1,8	CMM_0683 (*coaBC*)	*pantothenate metabolism flavoprotein*	I.5
1,8	CMM_1624	*transcriptional regulator, TetR family*	IV.3
1,8	CMM_0799 (*bldKB*)	*oligopeptide ABC transporter, substrate-binding lipoprotein*	IV.1
1,8	CMM_1486	*conserved membrane protein*	V.2
1,8	CMM_0685	*antimicrobial peptide ABC transporter, permease component*	IV.1
1,8	CMM_2081	*Mn2+/Fe2+ transport protein, NRAMP family*	IV.1
1,8	CMM_1831 (*glpK*)	*glycerol kinase*	IV.1
1,8	CMM_0058	*hypothetical protein*	V.2
1,7	CMM_1164 (*atpE*)	*ATP synthase, C chain*	IV.1
1,7	CMM_1217	*transcriptional regulator, ArsR family*	IV.3
1,7	CMM_0147	*putative signal peptidase I, serine peptidase family S26*	IV.2
1,7	CMM_1919	*hypothetical membrane protein*	V.2
1,7	CMM_1413	*conserved hypothetical protein*	V.2
1,7	CMM_0558	*hypothetical protein*	V.2
1,7	CMM_0619 (*putA*)	*delta-1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase /proline oxidase*	I.2
1,7	CMM_2553	*conserved membrane protein*	V.2
1,7	CMM_1152 (*lysA*)	*diaminopimelate decarboxylase*	I.2
1,6	CMM_0165 (*fhuC*)	*Fe3+-siderophore ABC transporter, ATPase*	IV.1
1,6	CMM_2012	*conserved hypothetical protein*	V.2
1,6	CMM_2135	*putative nucleoside-diphosphate-sugar epimerase*	I.3
1,6	CMM_2452	*transcriptional regulator, Cro/CI family, nucleotidyltransferase*	IV.3
1,6	CMM_2621 (*fusA*)	*elongation factor G (EF-G)*	III.3
1,6	CMM_1166 (*atpH*)	*ATP synthase delta chain*	IV.1
1,6	CMM_1527	*conserved hypothetical protein*	V.2
1,6	CMM_2846	*plasmid maintenance system, antidote protein*	II.1
1,6	CMM_2892	*transporter, RND family*	IV.1
1,6	CMM_0682 (*ilvG*)	*acetolactate synthase*	I.2
1,6	CMM_2453	*conserved hypothetical protein*	V.2
1,6	CMM_0924	*conserved membrane protein, putative pilus assembly protein*	IV.2
1,6	CMM_1504 (*fruA*)	*phosphoenolpyruvate-dependent fructose phosphotrans-ferase system, EIIA, EIIB, EIIC)*	IV.1
1,6	CMM_0830	*glycosyltransferase*	II.2
1,6	CMM_0730 (*purS*)	*phosphoribosylformylglycinamidine (FGAM) synthase*	I.3
1,6	CMM_0034	*sugar phosphate isomerase/epimerase*	I.1
1,6	CMM_0246	*hypothetical protein*	V.2
1,6	CMM_1633 (*panB*)	*3-methyl-2-oxobutanoate hydroxymethyltransferase*	I.5

Fortsetzung Tabelle 29: Höhere Transkriptmengen in XMM-Medium+AS als in XMM-Medium.

1,6	CMM_2798	*membrane bound metalloendopeptidase, family M23*	IV.7
1,6	CMM_2929 (*fecD2*)	*iron-siderophore ABC transporter, permease component*	IV.1
1,6	CMM_0388	*alkaline shock protein*	IV.4
1,6	CMM_0097 (*bglD*)	*beta-glucosidase, glycosyl hydrolase family 3*	I.1
1,6	CMM_0328	*oxidoreductase/methylase*	I.6
1,6	CMM_0870	*conserved hypothetical protein*	V.2
1,5	CMM_0324	*ABC transporter (fused permease/ATPase)*	IV.1
1,5	CMM_1923 (*ggtA*)	*gamma-glutamyltranspeptidase*	IV.5
1,5	CMM_2371 (*gltA1*)	*citrate synthase*	I.1
1,5	CMM_2779	*carboxylesterase*	V.1
1,5	CMM_2708	*hypothetical protein, putative excisionase*	V.2
1,5	CMM_2080	*membrane protein*	V.2
1,5	CMM_2389	*permease, DMT family*	IV.1
1,5	CMM_1618 (*fabH*)	*3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase III*	I.4
1,5	CMM_2768	*conserved membrane protein, TerC family*	IV.1
1,5	CMM_2296	*hypothetical protein*	V.2
1,5	CMM_1699 (*dnaJ3*)	*curved DNA binding protein*	IV.4
1,5	CMM_1676	*putative pseudogene homologous to C-terminus of XysB*	V.2
1,5	CMM_1686 (*tatC*)	*Sec-independent twin-arginine protein translocase protein*	IV.2
1,5	CMM_1314	*iron ABC transporter, substrate-binding protein*	IV.1
1,5	CMM_2757	*hypothetical membrane protein*	V.2
1,5	CMM_0065	*conserved hypothetical protein, putative phosphotransferase*	IV.5
1,5	CMM_0301	*transcriptional regulator, TetR family*	IV.3
1,5	CMM_1153 (*thrA*)	*homoserine dehydrogenase*	I.2
1,5	CMM_0646	*membrane protein*	V.2
1,5	CMM_0991 (*accA*)	*acetyl/propionyl-CoA carboxylase subunit*	I.4
1,5	CMM_1168 (*atpG*)	*ATP synthase, gamma chain (F-ATPase gamma subunit)*	IV.1
1,5	CMM_1301	*conserved membrane protein, putative pilus assembly protein*	IV.2
1,5	CMM_0109	*sugar ABC transporter, substrate-binding protein*	IV.1
1,5	CMM_1830 (*glpF*)	*glycerol uptake facilitator protein, MIP family*	IV.1
1,5	CMM_0638	*membrane- metalloendopeptidase,subfamily M23B*	IV.7
1,5	CMM_1105 (*ilvE*)	*branched-chain amino acid aminotransferase*	I.2
1,5	CMM_0127 (*sigX*)	*RNA polymerase sigma factor, ECF-subfamily*	IV.3
1,5	CMM_2106	*sugar ABC transporter, substrate-binding protein*	IV.1
1,5	CMM_2800	*conserved membrane protein*	V.2
1,5	CMM_2088	*oxidoreductase*	V.1
1,5	CMM_0035	*dehydrogenase/oxidoreductase*	V.1
1,4	CMM_0363	*Fe3+-hydroxamate ABC transporter, SBP*	IV.1
1,4	CMM_2854	*ATPase involved in chromosome partitioning*	II.1
1,4	CMM_2788 (*nusG*)	*transcription antitermination protein*	III.2
1,4	CMM_2930 (*fecC2*)	*iron-siderophore ABC transporter, permease component*	IV.1
1,4	CMM_0220	*conserved hypothetical protein*	V.2
1,4	CMM_0793	*myo-inositol dehydrogenase*	I.1
1,4	CMM_2422	*peptide ABC transporter, permease component*	IV.1
1,4	CMM_1026 (*gcdH*)	*glutaryl-CoA dehydrogenase*	II.2
1,4	CMM_0077	*conserved hypothetical protein*	V.2
1,4	CMM_2971 (*parB1*)	*chromosome partitioning protein*	II.1
1,4	CMM_0700	*two-component system, response regulator*	IV.3
1,4	CMM_1482 (*ileS*)	*isoleucyl-tRNA synthetase*	III.3
1,4	CMM_0400	*short chain dehydrogenase*	V.1
1,4	CMM_0658	*endoribonuclease L-PSP*	III.3
1,4	CMM_2107	*sugar ABC transporter, permease component*	IV.1
1,4	CMM_2780	*sugar hydrolase*	V.1
1,4	CMM_1485 (*ndkA*)	*nucleoside diphosphate kinase*	I.3
1,4	CMM_0154 (*hspR*)	*heat shock regulator, transcriptional regulator, MerR family*	IV.3
1,4	CMM_0637	*benzoate transport protein, BenE family*	IV.1
1,4	CMM_1295 (*rphA*)	*ribonuclease PH (TRNA nucleotidyltransferase)*	III.2
1,4	CMM_1169 (*atpD*)	*ATP synthase, subunit beta*	IV.1
1,4	CMM_1926	*esterase*	V.1
1,4	CMM_0633	*permease, DMT family*	IV.1
1,4	CMM_2867	*transcriptional regulator, MarR family*	IV.3
1,4	CMM_0355 (*bgaA*)	*beta-galactosidase*	I.1
1,4	CMM_2364	*conserved membrane protein*	V.2
1,4	CMM_0244	*two-component system, response regulator*	IV.3

Fortsetzung Tabelle 29: Höhere Transkriptmengen in XMM-Medium+AS als in XMM-Medium.

1,4	CMM_2108	*sugar ABC transporter, permease component*	IV.1
1,4	CMM_0350	*carbohydrate kinase*	I.1
1,4	CMM_0226	*hypothetical secreted protein*	V.2
1,4	CMM_2105	*conserved hypothetical protein*	V.2
1,4	CMM_0381 (*phnF*)	*transcriptional regulator, GntR family*	IV.3
1,4	CMM_2638	*conserved hypothetical protein*	V.2
1,4	CMM_0783	*transcriptional regulator, Cro/CI family*	IV.3
1,4	CMM_2172	*aminotransferase*	I.2
1,4	CMM_2370 (*metS*)	*DNA glycosylase*	III.3
1,4	CMM_2173 (*fdxB*)	*ferredoxin*	I.1
1,4	CMM_0146	*putative secreted metallopeptidase*	IV.6
1,4	CMM_1061	*hypothetical membrane protein*	V.2
1,3	CMM_2431	*hypothetical secreted protein*	V.2
1,3	CMM_0083 (*bglC*)	*beta-glucosidase/beta-xylosidase*	I.1
1,3	CMM_1977 (*rluA*)	*pseudouridine synthase*	III.3
1,3	CMM_1546 (*trpE2*)	*anthranilate synthase, component I*	I.2
1,3	CMM_2360	*conserved membrane protein*	V.2
1,3	CMM_1291	*conserved hypothetical protein*	V.2
1,3	CMM_1143	*short chain alcohol dehydrogenase*	V.1
1,3	CMM_0724 (*wcnA*)	*membrane-bound acyltransferase*	II.2
1,3	CMM_2646	*conserved hypothetical protein*	V.2
1,3	CMM_2071	*FAD/FMN-containing dehydrogenase*	V.1
1,3	CMM_0312	*acetyltransferase, GNAT family*	V.1
1,3	CMM_0354 (*nagB*)	*glucosamine-6-phosphate isomerase*	I.1
1,3	CMM_0422	*sugar ABC transporter, ATPase*	IV.1
1,3	CMM_1170 (*atpC*)	*ATP synthase, epsilon chain*	IV.1
1,3	CMM_2541	*ABC transporter, fused permease and ATPase*	IV.1
1,3	CMM_0679	*acetyltransferase*	V.1
1,3	CMM_1419	*short chain dehydrogenase/oxidoreductase*	V.1
1,3	CMM_0032	*membrane protein*	V.2
1,3	CMM_1688	*transcriptional regulator, DeoR family*	IV.3
1,3	CMM_0106 (*aglA*)	*alpha-glucosidase, glycosyl hydrolase family 31*	I.1
1,3	CMM_1154 (*thrC*)	*threonine synthase*	I.2
1,3	CMM_PS_01	*CMM_PS_01*	V.2
1,3	CMM_1538	*acetyltransferase*	V.1
1,3	CMM_2153	*NAD(P)H steroid dehydrogenase/isomerase*	I.1
1,3	CMM_1639	*conserved membrane protein*	V.2
1,3	CMM_0272	*sugar ABC transporter, permease component*	IV.1
1,3	CMM_2319	*hypothetical secreted protein*	V.2
1,3	CMM_2794	*ribonucleotide-diphosphate reductase, beta subunit*	I.3
1,3	CMM_2491	*conserved secreted protein*	V.2
1,3	CMM_2475	*two-component system, response regulator*	IV.3
1,3	CMM_1471	*acetyltransferase, GNAT family*	V.1
1,3	CMM_0777	*possibly involved in inositol metabolism*	I.1
1,3	CMM_0584	*acetyltransferase*	V.1
1,3	CMM_2126	*Zn-dependent alcohol dehydrogenase*	V.1
1,3	CMM_2405 (*sdaA*)	*L-serine dehydratase*	I.2.
1,3	CMM_1312	*iron ABC transporter, permease component*	IV.1
1,3	CMM_2353	*membrane protein*	V.2
1,3	CMM_0827 (*wcoI*)	*capsular polysaccharide synthesis enzyme*	II.2
1,3	CMM_0776	*NAD-dependent aldehyde dehydrogenase*	V.1
1,3	CMM_1610	*conserved secreted protein*	V.2
1,3	CMM_1707	*esterase*	V.1
1,3	CMM_1898	*hypothetical protein*	V.2
1,3	CMM_2761	*hypothetical protein*	V.2
1,3	CMM_0883 (*bglJ*)	*beta-glucosidase*	I.1
1,3	CMM_1400	*hypothetical secreted protein*	V.2
1,3	CMM_2375	*transcriptional regulator, TetR family*	IV.3
1,3	CMM_2047 (*pnpA*)	*polyribonucleotide nucleotidyltransferase*	III.3
1,3	CMM_1996 (*argG*)	*argininosuccinate synthase*	I.2
1,2	CMM_1628	*hypothetical protein*	V.2
1,2	CMM_0293	*MFS permease*	IV.1
1,2	CMM_1095 (*ilvH*)	*acetolactate synthase, small (regulatory) subunit*	I.2
1,2	CMM_2847	*plasmid maintemance system, killer protein*	II.1
1,2	CMM_0884	*acetyltransferase*	V.1

Fortsetzung Tabelle 29: Höhere Transkriptmengen in XMM-Medium+AS als in XMM-Medium.

1,2	CMM_0503	*transcriptional regulator, TetR family*	IV.3
1,2	CMM_1687 (*tatA*)	*Sec-independent twin-arginine protein translocase protein*	IV.2
1,2	CMM_1727	*putative Fe-S cluster assembly protein*	IV.5
1,2	CMM_2158 (*pknF*)	*serine/threonine protein kinase*	IV.3
1,2	CMM_0900	*DNA polymerase III, gamma and tau subunit*	III.1
1,2	CMM_1493 (*proA*)	*gamma-glutamyl phosphate reductase*	I.2.
1,2	CMM_1559	*conserved hypothetical protein*	V.2
1,2	CMM_2476	*two-component system, sensor kinase*	IV.3
1,2	CMM_2698	*sugar ABC transporter, permease component*	IV.1.
1,2	CMM_2169	*surface protein, putative RTX toxin*	II.2
1,2	CMM_0159	*conserved hypothetical protein*	V.2
1,2	CMM_0672	*conserved hypothetical protein, putative ATPase*	V.2
1,2	CMM_1477	*oligopeptide ABC transporter, permease component*	IV.1.
1,2	CMM_1555 (*lepA*)	*GTP-binding protein*	III.3
1,2	CMM_1396	*thioredoxin*	IV.5
1,2	CMM_1199	*NTP pyrophosphohydrolase*	III.1
1,2	CMM_1829	*dihydroxyacetone kinase*	I.1
1,2	CMM_1421	*conserved hypothetical protein, putative phosphoesterase*	V.2
1,2	CMM_1309 (*ftsE*)	*ABC transporter, ATPase involved in cell division*	IV.1.
1,2	CMM_0107	*sugar ABC transporter, permease compound*	IV.1.
1,2	CMM_2561 (*guaB2*)	*inosine-5'-monophosphate dehydrogenase*	I.3
1,2	CMM_1887 (*dctR*)	*two-component system, response regulator*	IV.3
1,2	CMM_1360	*acetyltransferase*	V.1
1,1	CMM_2647	*putative phospholipase/carboxylesterase*	V.2
1,1	CMM_1913	*amino acid permease, APC family*	IV.1.
1,1	CMM_0404	*two-component system, response regulator*	IV.3
1,1	CMM_2218	*phosphatase*	V.2
1,1	CMM_2402	*conserved hypothetical protein*	V.2
1,1	CMM_2806	*ferredoxin/ferredoxin-NADP reductase*	I.5
1,1	CMM_2316	*putative phosphomutase/lyase*	V.2
1,1	CMM_1411	*conserved secreted protein*	V.2
1,1	CMM_1767 (*trpE1*)	*anthranilate synthase, component I*	I.2.
1,1	CMM_1852	*cell division initiation protein*	II.1
1,1	CMM_0890	*membrane protein*	V.2
1,1	CMM_1763 (*trpB*)	*tryptophan synthase, beta chain*	I.2.
1,1	CMM_1308 (*prfB*)	*peptide chain release factor RF-2*	III.3
1,1	CMM_2260	*serine peptidase, family S8*	IV.7
1,1	CMM_1278	*serine protease, family S1B*	IV.7
1,1	CMM_2380 (*prpD*)	*2-methylcitrate dehydratase*	I.1
1,0	CMM_0128	*conserved secreted protein*	V.2

Tabelle 30: Mittels Microarray-Experiment ermittelte *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*-Gene, deren Transkriptmengen in XMM + 20 µM Acetosyringon (AS) im Vergleich mit XMM erniedrigt waren. 198 Gene wurden identifiziert, von denen 63 eine 2- oder mehrfach veränderte Transkriptmenge zeigten. Die Gene wurden nach dem absteigenden FCA-Wert geordnet. FCA: *fold change absolute*.

FCA	Gen-Name	Mögliche Funktion	COG
11,9	pCM2_0036	*conserved hypothetical protein, similar to LSR2 protein*	V.2
9,7	pCM1_0013	*hypothetical protein*	IV.2
7,9	pCM1_0004 (*parB*)	*hypothetical protein, putative partitioning protein*	II.1
7,4	pCM2_0064	*hypothetical protein*	V.2
6,4	pCM2_0006	*hypothetical protein*	V.2
4,6	CMM_0062	*hypothetical protein, putative single-strand binding protein*	V.2
4,6	CMM_1599 (*fclA*)	*fucose synthase*	II.2
4,5	CMM_0911	*hypothetical protein*	II.2
4,5	pCM2_0028	*conserved secreted protein*	V.2
4,2	CMM_1956	*monooxygenase*	V.1
4,1	CMM_2714	*conserved hypothetical protein*	V.2
4,0	CMM_2279	*conserved membrane protein, LysE transporter family*	IV.1
3,7	pCM2_0066	*conserved hypothetical protein*	V.2
3,6	CMM_0061	*cell filamentation protein*	II.1
3,6	CMM_2716	*conserved membrane protein*	V.2

Fortsetzung Tabelle 30: Transkriptmenge in XMM-Medium+AS niedriger als in XMM-Medium.

3,6	CMM_1600 (*gmdA*)	*GDP-mannose 4,6-dehydratase*	II.2
3,4	pCM1_0005 (*traG*)	*membrane protein*	IV.2
3,4	CMM_1928	*membrane protein*	V.2
3,4	pCM1_0016	*lipoprotein, putative*	IV.2
3,4	CMM_0074	*conserved hypothetical protein*	V.2
3,4	CMM_1252	*choline/glycine/betaine transporter, BCCT family*	IV.1
3,3	CMM_2688	*unnamed protein product; putative acetyl xylan esterase*	I.1
3,2	CMM_2720	*membrane protein*	V.2
3,0	CMM_0185 (*metC*)	*o-acetylhomoserine (thiol)-lyase*	I.2
3,0	CMM_2401	*conserved hypothetical protein*	V.2
3,0	CMM_2400	*o-acetylhomoserine (thiol)-lyase*	I.2
3,0	CMM_2033	*conserved hypothetical protein*	IV.1
2,9	pCM2_0067	*hypothetical protein*	V.2
2,9	pCM1_0011	*hypothetical secreted protein*	IV.2
2,8	pCM1_0023 (*ppaJ*)	*extracellular serine protease*	IV.6
2,8	pCM2_0065	*hypothetical protein*	V.2
2,8	CMM_2032	*ABC transporter, ATPase component*	IV.1
2,8	CMM_1185	*ATPase*	V.1
2,8	CMM_2116 (*thiED*)	*thiamine-phosphate synthase/phosphomethylpyrimidine kinase*	I.5
2,8	CMM_0184 (*metE1*)	*methionine synthase II*	I.2
2,7	CMM_1955	*conserved hypothetical protein*	V.2
2,7	CMM_1067 (*ansP*)	*L-asparagine permease, APC family*	IV.1
2,7	CMM_1973	*acyl-CoA dehydrogenase*	V.1
2,6	CMM_0183	*aminotransferase*	I.2
2,6	CMM_1466	*monooxygenase*	V.1
2,6	CMM_2717	*conserved hypothetical protein*	V.2
2,5	CMM_1336 (*metY*)	*o-acetylhomoserine (thiol)-lyase*	I.2
2,5	CMM_1572	*two-component system, sensor kinase*	IV.3
2,5	CMM_2060	*cysteine peptidase, family C56*	IV.7
2,4	CMM_0644	*two-component system, response regulator*	IV.3
2,4	CMM_0694	*ATP/GTP binding protein*	V.1
2,4	CMM_1602 (*wcmI*)	*acetyltransferase involved in polysaccharide biosynthesis*	II.2
2,4	CMM_1573	*two-component system, response regulator*	IV.3
2,4	pCM1_0015	*secreted protein*	IV.2
2,3	CMM_1230	*hypothetical protein*	V.2
2,3	CMM_2283	*metal ABC transporter, substrate-binding protein*	IV.1
2,2	CMM_2097	*hypothetical protein*	V.2
2,2	CMM_2282	*metal ABC transporter , ATPase*	IV.1
2,1	CMM_0737 (*katA*)	*catalase*	IV.5
2,1	CMM_1605 (*wzy1*)	*exopolysaccharide polymerase*	II.2
2,1	CMM_0430	*hypothetical secreted protein, putative cell-surface protein*	II.2
2,1	CMM_0560	*transcriptional regulator*	IV.3
2,1	CMM_1435	*ABC transporter, ATPase*	IV.1
2,0	CMM_2059	*hypothetical protein*	V.2
2,0	CMM_1265	*unnamed protein product; conserved secreted protein*	V.2
2,0	CMM_2098	*short chain dehydrogenase/oxidoreductase*	V.1
2,0	CMM_1601 (*wcmH*)	*glycosyltransferase*	II.2
2,0	pCM2_0055	*hypothetical protein*	V.2
2,0	CMM_1933	*arylesterase*	V.1
2,0	CMM_2687	*short-chain dehydrogenase/oxidoreductase*	II.2
2,0	CMM_1954	*conserved hypothetical protein*	V.2
2,0	CMM_2281	*metal ABC transporter , permease component*	IV.1
1,9	CMM_2031	*ABC transporter, permease component*	IV.1
1,9	CMM_1945	*acyl-CoA dehydrogenase*	V.1
1,9	CMM_2121	*glutathione S-transferase*	IV.5
1,9	CMM_1382	*sugar MFS permease*	IV.1
1,9	CMM_1282	*CDP-glycerol/poly(glycerophosphate), glycerophosphotransferase*	II.2
1,9	CMM_0132	*hypothetical protein*	V.2
1,9	CMM_2221	*hypothetical protein*	V.2
1,9	CMM_1101	*transcriptional regulator, TetR family*	IV.3
1,9	CMM_1819	*conserved protein putatively involved in pyridoxine biosynthesis*	I.5
1,9	pCM2_0063	*hypothetical protein*	V.2
1,8	CMM_1259	*alpha-mannosidase*	I.1

Fortsetzung Tabelle 30: Transkriptmenge in XMM-Medium+AS niedriger als in XMM-Medium.

1,8	pCM1_0018	*secreted protein*	IV.2
1,8	CMM_0661	*conserved hypothetical protein*	V.2
1,8	CMM_0663	*carboxylesterase, type B*	V.1
1,7	CMM_0736 (*furA*)	*transcriptional regulator, Fur family*	IV.3
1,7	CMM_0877 (*araD*)	*L-ribulose-5-phosphate 4-epimerase*	I.1
1,7	CMM_1608 (*wzx1*)	*membrane protein involved in the export of EPS*	II.2
1,7	CMM_1575	*conserved membrane protein*	V.2
1,7	CMM_0113	*hydrolase*	V.1
1,7	CMM_1607 (*wcmM*)	*serine acetyltransferase*	II.2
1,7	CMM_1609 (*wcmN*)	*undecaprenyl-phosphate glycosyl-1-phosphate transferase*	II.2
1,7	CMM_0868	*alpha-glucoside ABC transport system, permease component*	IV.1
1,7	CMM_2155	*3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase*	I.4
1,7	CMM_2923	*hypothetical membrane protein*	V.2
1,7	CMM_1102	*efflux MFS permease*	IV.1
1,6	CMM_1946	*oxidoreductase/monooxygenase*	V.1
1,6	CMM_2628	*polar amino acid ABC transporter, substrate-binding protein*	IV.1
1,6	CMM_0532 (*panD*)	*aspartate 1-decarboxylase precursor (Aspartate alpha-decarboxylase)*	I.5
1,6	CMM_1237	*NDP-sugar phosphate epimerase*	I.1
1,6	CMM_1570	*conserved membrane protein*	V.2
1,6	CMM_1324	*conserved membrane protein*	V.2
1,6	CMM_1670	*oxidoreductase*	V.1
1,6	CMM_1403 (*trmU*)	*tRNA-methyltransferase*	III.3
1,6	CMM_1622 (*ahpE*)	*thiol-specific antioxidant protein*	IV.5
1,5	CMM_0879	*sugar ABC transporter, substrate-binding protein*	IV.1
1,5	CMM_2901	*hypothetical protein*	V.2
1,5	CMM_2235	*ATPase*	V.1
1,5	CMM_1678	*mutT-like protein*	III.1
1,5	CMM_2185	*peptide ABC transporter, substrate-binding protein*	IV.1
1,5	CMM_2816 (*menA*)	*1,4-dihydroxy-2-naphthoate octaprenyltransferase*	I.5
1,5	pCM2_0061	*hypothetical protein*	V.2
1,5	pCM2_0018	*conserved hypothetical protein, putative ATPase*	IV.2
1,5	pCM2_PSEUDO_0005	*pCM2_PSEUDO_0005*	IV.3
1,5	CMM_2053	*membrane protein*	V.2
1,5	CMM_2711	*hypothetical protein*	V.2
1,5	CMM_2856	*aldo/keto reductase*	V.1
1,5	CMM_0610	*glyoxylase family protein*	IV.5
1,4	CMM_2577 (*coaA*)	*pantothenate kinase*	I.5
1,4	CMM_1612A	*hypothetical protein*	V.2
1,4	CMM_1679	*conserved hypothetical protein*	IV.7
1,4	CMM_1398	*glycosidase*	I.1
1,4	CMM_1434	*ABC-type transporter, permease component*	IV.1
1,4	CMM_1659 (*acnA*)	*aconitate hydratase*	I.1
1,4	CMM_0240	*short-chain alcohol dehydrogenase*	V.1
1,4	CMM_1436	*ABC transporter, permease component*	IV.1
1,4	CMM_1642 (*lpdB*)	*pyruvate/2-oxoglutarate dehydrogenase complex dihydrolipoamide dehydrogenase (E3) component*	I.1
1,4	CMM_2460	*ATPase*	II.1
1,4	CMM_2184	*peptide ABC transporter, permease component*	IV.1
1,4	CMM_1310 (*ftsX*)	*ABC transporter, permease component, involved in cell division*	IV.1
1,4	CMM_2210	*two-component response regulator*	V.2
1,4	CMM_1823 (*glpD*)	*glycerol-3-phosphate dehydrogenase*	I.1
1,4	pCM2_0062	*hypothetical protein*	V.2
1,4	CMM_1569	*metal-dependent hydrolase*	IV.7
1,4	CMM_0592	*conserved membrane protein*	I.5
1,4	CMM_1242	*two-component system, response regulator*	IV.3
1,4	CMM_0892	*hypothetical protein*	V.2
1,4	CMM_1720 (*serB2*)	*phosphoserine phosphatase*	I.2
1,4	CMM_0720 (*wcnC*)	*undecaprenyl-phosphate sugar phosphotransferase*	II.2
1,4	CMM_0594	*conserved hypothetical protein*	I.5
1,4	CMM_0858 (*galE2*)	*UDP-glucose 4-epimerase*	I.1
1,4	CMM_2445	*acetyltransferase*	V.1
1,4	CMM_1737 (*zwfA2*)	*glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase*	I.1

Fortsetzung Tabelle 30: Transkriptmenge in XMM-Medium+AS niedriger als in XMM-Medium.

1,4	pCM2_PSEUDO_0004	*pCM2_PSEUDO_0004*	V.2
1,4	CMM_1107	*lipoprotein, putative*	V.2
1,3	CMM_1359 (*fpgA*)	*formamidopyrimidine-DNA glycosylase*	III.1
1,3	CMM_0465	*hypothetical protein*	V.2
1,3	CMM_1462	*membrane protein*	V.2
1,3	CMM_0702	*acetyltransferase*	V.1
1,3	CMM_0507 (*lplA*)	*lipoate-protein ligase A*	I.5
1,3	CMM_2754 (*kdpD*)	*two-component system, sensor kinase*	IV.3
1,3	CMM_2955	*glycosyl transferase*	II.2
1,3	CMM_1531 (*proZ*)	*proline/glycine/betaine/choline ABC transporter, permease component*	IV.1
1,3	CMM_1264	*conserved hypothetical protein*	V.2
1,3	CMM_0046	*hypothetical protein, putative phage protein*	V.2
1,3	CMM_0865	*transcriptional regulator, LacI family*	IV.3
1,3	CMM_2866	*conserved hypothetical protein, putative hydrolase*	V.2
1,3	CMM_2590 (*mtlF*)	*PTS system mannitol-specific IIA component*	IV.1
1,3	CMM_1288	*sugar nucleotidyltransferase*	II.2
1,3	CMM_0452	*acetyltransferase*	V.1
1,3	CMM_0546 (*trkG*)	*potassium uptake protein, Trk family*	IV.1
1,3	CMM_0288	*oxidoreductase*	V.1
1,3	CMM_2084 (*pitB*)	*low-affinity inorganic phosphate permease*	IV.1
1,3	CMM_0761	*amino acid permease, APC family*	IV.1
1,3	CMM_1174	*transcriptional regulatory protein, AsnC family*	IV.3
1,3	CMM_0904 (*mqoA*)	*malate:quinone oxidoreductase*	I.1
1,2	CMM_0349	*transcriptional regulator, DeoR family*	IV.3
1,2	CMM_2855	*conserved membrane protein, putative multidrug exporter MOP(MATE) family*	IV.1
1,2	CMM_0251	*transcriptional regulator, LacI-family*	IV.3
1,2	CMM_2737	*peptide ABC transporter, ATP-binding protein*	IV.1
1,2	CMM_1448	*hypothetical protein*	V.2
1,2	CMM_2065	*two-component system sensor kinase*	IV.3
1,2	CMM_1283	*conserved membrane protein*	V.2
1,2	CMM_2587 (*rpmJ*)	*50S ribosomal protein L36*	III.1
1,2	CMM_2352	*conserved hypothetical protein*	V.2
1,2	CMM_0199	*hypothetical protein*	V.2
1,2	CMM_0516	*hydrolase, HAD superfamily*	V.1
1,2	CMM_2537 (*icdA*)	*isocitrate dehydrogenase*	I.1
1,2	CMM_1574	*membrane bound esterase*	V.1
1,2	CMM_1940	*transposase, IS481 family*	III.1
1,2	CMM_2099	*hypothetical protein*	V.2
1,2	CMM_1850 (*dnaE2*)	*DNA polymerase III alpha subunit*	III.1
1,2	CMM_2588 (*infA*)	*translation initiation factor IF-1*	III.3
1,2	CMM_1427 (*dinB*)	*DNA polymerase IV*	III.1
1,2	CMM_2480	*hypothetical protein*	V.2
1,2	CMM_2691	*endoglucanase*	IV.6
1,2	CMM_1341 (*leuC*)	*3-isopropylmalate dehydratase large subunit*	I.2
1,2	CMM_1197 (*uvrD2*)	*ATP-dependent DNA helicase*	III.1
1,2	CMM_1120 (*ungA*)	*uracil-DNA glycosylase*	III.1
1,2	CMM_1861 (*murD*)	*UDP-N-acetylmuramoylalanine-D-glutamate ligase*	II.2
1,1	CMM_2576 (*glmS*)	*glucosamine-fructose-6-phosphate aminotransferase*	I.1
1,1	CMM_1492 (*proB*)	*glutamate 5-kinase (Gamma-glutamyl kinase)*	I.2
1,1	CMM_1417	*short-chain dehydrogenase*	V.1
1,1	CMM_1729	*2Fe-2S ferredoxin*	IV.5
1,1	CMM_0321	*oxidoreductase*	V.1
1,1	CMM_2942	*2-keto-acid dehydrogenase, dihydrolipoamide acetyltransferase E2 component*	I.1
1,1	CMM_2174	*conserved hypothetical protein*	IV.5
1,1	CMM_1702	*glycine/betaine/choline ABC transporter, permease*	IV.1
1,1	CMM_0598 (*hemB*)	*porphobilinogen synthase*	I.5
1,1	CMM_1816 (*ruvC*)	*crossover junction endodeoxyribonuclease*	III.1
1,1	CMM_0595 (*hemH*)	*ferrochelatase*	I.5
1,1	CMM_2755 (*kdpE*)	*two-component system, response regulator*	IV.3

7.5 MALDI-ToF-Daten der Analyse von Transkriptionsregulatoren von *Cmm*382

Um mögliche Transkriptionsregulatoren für *pat-1* und *celA* zu identifizieren, wurde der Proteinextrakt einer *Cmm*382-Kultur in Minimalmedium M9, Apoplasten-Medium XVM2 und in Xylemsaft-imitierendem Medium XMM zu den 500 bp-umfassenden Promotorregionen gegeben und spezifisch gebundene Proteine mittels NaCl-Gradient eluiert. Die Proteine in den Elutionsfraktionen wurden anschließend mit Hilfe der MALDI-ToF Massenspektrometrie identifiziert. In Tabelle 31 sind die Proteine aufgelistet, deren Genprodukte Regulatoren darstellen.

Tabelle 31: Mit Hilfe von MALDI-ToF MS ermittelte putative Transkriptionsregulatoren von *pat-1* und *celA.* 42 Regulatoren hatten an die Promotorregionen von *pat-1* (p) und *celA* (c) gebunden, 33 nur an die *pat-1*-Promotorregion und 15 nur an die *celA*-Promotorregion. Die entsprechenden Proteinextrakte wurden aus einer *Cmm*382-Kultur in Minimalmedium (M), XVM2-Medium (2) und Xylemsaft-imitierendem Medium XMM (X) hergestellt. MW: Molekulargewicht (*molecular weight:* MW).

Gen-Name	MW	Funktion/Familie	Promotorregion	Medium
CMM_0036	38 kDa	LacI-Familie	p,c	X
CMM_0091 (*regB*)	23 kDa	Antwortregulator	p	X
CMM_0118	27 kDa	TetR-Familie	p	X, M
CMM_0140	17 kDa	MarR-Familie	p	M
CMM_0161	35 kDa	LacI-Familie	c	X
CMM_0257	23 kDa	MerR-Familie	p,c	X
CMM_0275	45 kDa	Rok-Familie	p	X
CMM_0301	26 kDa	TetR-Familie	p,c	X, M
CMM_0349	26 kDa	DeoR-family	p	X
CMM_0358	37 kDa	LacI-Familie	p	X
CMM_0381 (*phnF*)	26 kDa	GntR-Familie	p,c	X, M
CMM_0404	26 kDa	Antwortregulator	p,c	X, M
CMM_0425	37 kDa	LacI-Familie	p,c	X
CMM_0440	18 kDa	MarR-Familie	p	M
CMM_0473	30 kDa	Antwortregulator	p,c	X
CMM_0519	38 kDa	Transkriptionsregulator	p	X
CMM_0536	16 kDa	MarR-Familie	c	X, 2
CMM_0537	28 kDa	PhoB-ähnlich	p,c	X, M
CMM_0618	34 kDa	Cro/CI-Familie	c	X
CMM_0625	13 kDa	GntR-Familie	c	2, M
CMM_0673	24 kDa	TetR-Familie	p,c	X
CMM_0691	16 kDa	MarR-Familie	c	X
CMM_0733	25 kDa	GntR-Familie	p,c	X, M
CMM_0763	51 kDa	HTH-Domäne	c	X
CMM_0783	31 kDa	Cro/CI-Familie	p,c	X, M
CMM_0785	25 kDa	GntR-Familie	p,c	X, M
CMM_0789	28 kDa	GntR-Familie	p,c	X, M
CMM_0806	25 kDa	GntR-Familie	p	X
CMM_0863	17 kDa	MarR-Familie	c	X
CMM_0865	36 kDa	LacI-Familie	p,c	X
CMM_0948	40 kDa	LacI-Familie	p,c	X
CMM_0995	25 kDa	Antwortregulator	p	X
CMM_1063	18 kDa	Transkriptionsregulator	p	X
CMM_1070	15 kDa	MarR-Familie	c	X, 2
CMM_1147	37 kDa	LacI-Familie	p,c	X
CMM_1174	17 kDa	AsnC-Familie	p,c	X, 2, M
CMM_1183	32 kDa	LysR-Familie	p,c	X, M
CMM_1219	23 kDa	TetR-Familie	p	X
CMM_1228	22 kDa	Cro/CI-Familie	p	X

Fortsetzung Tabelle 31: putative Transkriptionsregulatoren von pat-1 *und* celA.

CMM_1242	32 kDa	Antwortregulator	p,c	X, M
CMM_1263	44 kDa	Rok-Familie	p,c	X
CMM_1271	25 kDa	Antwortregulator	p	X
CMM_1284	12 kDa	Cro/CI-Familie	p	M
CMM_1331	24 kDa	Antwortregulator	p,c	X
CMM_1338	24 kDa	TetR-Familie	p,c	X, M
CMM_1449	21 kDa	MarR-Familie	p	X
CMM_1474	52 kDa	Cro/CI-Familie	c	X
CMM_1479	20 kDa	TetR-Familie	p,c	X, 2, M
CMM_1502	27 kDa	DeoR-family	p	X
CMM_1573	25 kDa	Antwortregulator	p	X
CMM_1614	21 kDa	PadR-Familie	p	X
CMM_1620	46 kDa	Terminator	p,c	X, M
CMM_1689	37 kDa	Transkriptionsregulator	p,c	X
CMM_1746 (*whiA*)	35 kDa	Transkriptionsregulator	p,c	X
CMM_1757	22 kDa	Antiterminator	p	2
CMM_1822	34 kDa	Cro/CI-Familie	p,c	X
CMM_1847 (*nrdR*)	17 kDa	Globaler Repressor	p,c	X, 2, M
CMM_1883	25 kDa	MerR-Familie	p,c	X, M
CMM_1887 (*dctR*)	25 kDa	Antwortregulator	p	X
CMM_2018 (lexA)	24 kDa	Transkriptionsregulator	c	X
CMM_2132	31 kDa	TetR-Familie	p,c	X
CMM_2151 (*nusA*)	36 kDa	Transkriptionsregulator	p,c	X, 2, M
CMM_2189	30 kDa	RpiR-Familie	p,c	X, M
CMM_2199	13 kDa	GntR-Familie	c	M
CMM_2335	31 kDa	Antwortregulator	p,c	X
CMM_2345	17 kDa	Transkriptionsregulator	p	X
CMM_2355	36 kDa	LacI-Familie	p	X
CMM_2357	11 kDa	ArsR-Familie	c	X
CMM_2375	21 kDa	TetR-Familie	p	X
CMM_2385	22 kDa	TetR-Familie	p,c	X, M
CMM_2408	28 kDa	IclR-Familie	p,c	X, 2, M
CMM_2475	26 kDa	Antwortregulator	p	X
CMM_2492	25 kDa	Antwortregulator	p	X
CMM_2501 (*glnR*)	25 kDa	OmpR-Familie	p,c	X, M
CMM_2525	31 kDa	LysR-Familie	p,c	M
CMM_2645	23 kDa	TetR-Familie	p,c	X
CMM_2677	22 kDa	TetR-Familie	p	X
CMM_2680	17 kDa	MarR-Familie	c	X, 2, M
CMM_2747	10 kDa	Cro/CI-Familie	p	X
CMM_2755 (*kdpE*)	26 kDa	Antwortregulator	p	X
CMM_2766	28 kDa	Antwortregulator	p,c	X, 2
CMM_2811	19 kDa	Transkriptionsregulator	p	X
CMM_2829	19 kDa	MarR-Familie	p	X, M
CMM_2841	38 kDa	LacI-Familie	p	X
CMM_2867	17 kDa	MarR-Familie	c	X, 2
CMM_2876	24 kDa	Antwortregulator	p,c	X, M
CMM_2894	21 kDa	TetR-Familie	p	X
CMM_2906	27 kDa	GntR-Familie	p,c	M
CMM_2969	48 kDa	Aminotransferase-Domäne	c	X
pCM2_0056	36 kDa	Transkriptionsregulator	p,c	X
CMM_0036	38 kDa	LacI-Familie	p,c	X
CMM_0091 (*regB*)	23 kDa	Antwortregulator	p	X
CMM_0118	27 kDa	TetR-Familie	p	X, M
CMM_0140	17 kDa	MarR-Familie	p	M
CMM_0161	35 kDa	LacI-Familie	c	X
CMM_0257	23 kDa	MerR-Familie	p,c	X
CMM_0275	45 kDa	Rok-Familie	p	X
CMM_0301	26 kDa	TetR-Familie	p,c	X, M
CMM_0349	26 kDa	DeoR-family	p	X
CMM_0358	37 kDa	LacI-Familie	p	X
CMM_0381 (*phnF*)	26 kDa	GntR-Familie	p,c	X, M

7.6 RNA-Sequenzierung des gesamten 5'-Transkriptoms von *Cmm*382 in M9- und TBY-Medium

Nach der Kultivierung von *Cmm*382 in Minimalmedium wurde die RNA isoliert und eine Sequenzierung der 5'-Enden im CeBiTec der Universität Bielefeld durchgeführt. Durch die Analyse der stromaufwärts liegenden Regionen von 48 Genen konnten Aussagen über vorhandene Promotorstrukturen (-10- und -35-Region sowie Shine-Dalgarno-Sequenz), Transkriptionsstartpunkte und *leaderless*-Transkripte, bei denen Transkriptions- und Translationsstartpunkt identisch sind, getroffen werden. In Tabelle 32 sind die stromaufwärts liegenden Regionen der 48 Gene aufgelistet sowie, wenn vorhanden, Promotorstrukturen und Transkriptionsstartpunkte. In Tabelle 33 sind die Gene, und die zugehörigen COG-Gruppen, aufgelistet, deren Transkripte mittels manueller Analyse als *leaderless*-Transkripte identifiziert wurden. Bei diesen Transkripten sind Transkriptions- und Translationsstartpunkt identisch. In Tabelle 34 sind die Gene aufgelistet, bei denen mittels manueller Analyse interne *reads* im offenen Leserahmen beobachtet wurden.

Tabelle 32: Analyse der stromaufwärtsliegenden Regionen von 48 Genen im Genom von *Cmm*382 nach der RNA-Sequenzierung des 5'-Transkriptoms von *Cmm*382. Aufgelistet ist das nächstgelegene Gen, dessen mögliche Funktion, die Sequenz, stromaufwärts des Gens mit der -10- und -35-Region (rot), dem Transkriptionsstartpunkt (groß, fett, unterstrichen), der Shine-Dalgarno-Sequenz (grün) und dem Startcodon des Gens (fett). Außerdem ist die Anzahl der Basenpaare vom Transkriptionsstartpunkt bis zum Startcodon aufgelistet. [bp]: Abstand des Transkriptionsstartpunktes zum Startcodon in bp.

Gen (mögliche Funktion)	Sequenz	[bp]
pCM1_0009 (*conserved hypothetical protein)*	acctgggattgccgatgtcggtggagtgctgtacacctgatcccGtggtgctcgcat ggggagcgcctaaatgtgcagcacgatcaaggggagggtgcaac**atg**	57
pCM1_0023 (*extracellular serine protease)*	ggacacagttccacgccggaggagcatgtgagtatcgtccgcgcAtgactttcact ggacgccaccctcgtaccctgtccgctttgatc**gtg**	45
pCM2_0036 (*transcriptional regulator)*	tcatgaccgtcaaatgtgcactgggcagaccaaggcatgtatcgtgggattCagc gcatcgttaccgcgctgaatccgtatgggaggaaattag**atg**	44
pCM2_0042 (*hypothetical protein)*	gtgtggataagcgcgtcagtcggaactgcttcctatctatatttgtcaaTtcattcgag agggagctccatcacc**atg**	27
CMM_0009 (*hypothetical protein)*	cgtcgtgttttgcccgcagaggcacccgtgccagactgggattCctggcgaaatca caccg**atg**	18
CMM_0053 (*extracellular serine protease)*	cagagactcggagcacacgcgccgaaggcagatagcttgtccgatGacgaatc gtctatcgaacaaactttgaggaggccgccg**tg**	38
CMM_0388 (*alkaline shock protein)*	ggacgtgcgggacgagccgggtgcccggcccgtctccttgacGtgccggtcatc cagccggcaccgcgatccccgacgggagcgcgccccatccaccacaggagca ccac**atg**	68
CMM_0486 (*putative general stress protein)*	ctgtcaggtgttcaggagccgtccgtcctacagtccagtcGtgggccgcacccggt ggcctcagtgaggaggagatc**atg**	37
CMM_0529 (*hypothetical protein)*	cgggggactccggtatccccgcacctcccgcgtcgggtagcgtggacagGcgc cgtccggccgaccggcatcctcggtccggcgacggcgcggcgatggaaa**gtg**	53
CMM_0662 (*NADP-dependent alcohol dehydrogenase)*	cgccggttcgaggatccgcccccgcaggcgtaccgtcgagggGtaccgcatcc gaagagggcgcggccggatcgacccgatccctcccctcccccaccggtcagca caaggagaacccc**atg**	75
CMM_0857 (*ATP-dependent protease)*	acaggggcatgcactcctcgaacccgtcgttactctctacatatCggcgccggccc cctgccccggtgcccagggagatacag**atg**	39
CMM_0858 (*UDP-glucose 4-epimerase)*	gtcctccatgcggctgtcgcctccccgggctgcgggccaggatgggatgcGggc ggaaccgcccacgaaggagatgctcgctg**atg**	33
CMM_1027 (*mannose-6-phosphate isomerase)*	cgagcctaggtcggcgtccgggcggcggccccatcggttggtactttggtcgcGtc cggacaggacgcgcgcccacgggcgttgtaggtagccgccaagcccgacagg atcccgac**gtg**	62

Fortsetzung Tabelle 32: Analyse der stromaufwärts liegenden Regionen von 48 Genen.

CMM_1136 (*conserved hypothetical protein)*	ggcggcttcggcggaggcggcggcggcttcagcggcggcgac**C**ttctagc gacgaccagcacgacgacgagaacgagagcgacccatgatcaacccattccg acgaagcaccagacgagaaggagcagcaccc**atg**	94
CMM_1164 (*ATP synthase, C chain)*	acgctcttcgagctgctcgtcgccgtcctgcaggcctacatcttcgc**C**ctcctcaccg ccgtctacatccagatggccgtggcggaggagcactaagcgatctcgtcgaccaa cgagatcacccaaccggaaggaaacccca**gtg**	98
CMM_1192 (*ATP-dependent RNA helicase)*	ggcggaggcggccatcgggcgcccgcccgctaaactcgcccgt**G**gtccctcaac ggaagggccccatcgcgcccgcagagaagcagtccgggcgtggaccgcaccg ctagacagggcacaac**gtg**	78
CMM_1395 (*conserved membrane protein)*	cccggggcaggcgctcccagggtcgtccggtatccttcgat**G**tcgtcgtccgccgc cggtccgcctgcagcacggcggagcgtcgcgagagcacccgtgctcgtcggccg ccgcggtcgtcatccgatcgctgctcatgcggccgccgcccgcgacgacacgaga ggagacacccc**gtg**	135
CMM_1551 (*30S ribosomal protein S20)*	cccgcggcctgatttcccggccgcgacctggtatcgtcgcct**G**ttggcttgcgtgtgg tcctccccgatcacgcggtatcgccgcaggcgccctctctcgctgagcggcaactc atacgacgacaactcgaacggaagacataacac**gtg**	105
CMM_1611 (*cold shock protein)*	atcccccgctggcgcggtttcacccgctagggttggtca**C**aagtcgtcaggtcctca cgatccgcccggtccgccggaggggtcacgaggggcaggcgacccgcggtccc gggtcccgggatcgatgcatctcttttgaaggaaatttcgtc**atg**	115
CMM_1617 (*acyl carrier protein)*	gtcctcccctgagcccacccgccccataagctgttccg**G**tcatcacgaaccacga ggagatacac**atg**	27
CMM_1625 (*conserved membrane protein)*	gccgccccgccgcatgcgcccgcaccatgtccccactatagtgaacgcc**G**ttca ggtgaacatcgttcaggtccatgatcgtcgcatcacgcaggaggaagccc**atg**	55
CMM_1654 (*conserved hypothetical protein)*	aggacggtttgctatccggatgcgattcatgcaaactgtgccc**G**ccgattccgttcg gcggttattcgagaagtggacagga**atg**	40
CMM_1670 (*oxidoreductase)*	gacgggcggcacggtgtcggccccggcgtacggtgggaggc**C**agcggtagggc gcgcacctcggcgccgccgcaccccgtgaccatcgagacgaagaagacgaga gcac**atg**	73
CMM_1687 (*Sec-independent twin-arginine protein translocase protein)*	tgccgcacagggtgtcctgacgggtcgcgacggtagactcgccgt**G**gatcccgac aacgactgtccggcccccgacctgaaggaacgtgaaccac**atg**	49
CMM_1752 (*30S ribosomal protein S1)*	cgcggcgcggttgtccgcctccgcggccgggtctaagatcgact**G**tcgcacttct gcgacgacccatccgtccgccgctcgaccggtacccgcgcgggtccgcgccagc ggccttattcatgcccatcctggagcactaactac**atg**	99
CMM_1813 (*preprotein translocase subunit)*	tgtcgccgggccctcttcggcga**tga**actatgattcaagct**G**gcctcccgcggaa cgtcgccggttcgtcgtgtccgtcacctcccagcatctgaaaggcccgtcccgc**atg**	67
CMM_1830 (*glycerol uptake facilitator protein)*	ccgcgacagggaggtgcgccctaccggcactagattggagc**C**accgcgatgatg cggaagaggtcgccccgcgcctcgacgaacgatcggagcaccacgca**gtg**	60
CMM_2048 (*30S ribosomal protein S15)*	tccgcccggtcccggggtgtcgccccctggtatgctcgt**G**cggttgccgtctgaa cggccgcggatcaagagagctcgcacatcctgtgacgggcgccgcgcaacgaa cacgagaggggatcatcac**atg**	88
CMM_2151 (*transcriptional termination/antitermination factor)*	ccgcgcccccacccgaggctgcccgacccctcccggtcgggtagcctcga**G**tgtt tccaaccgaatagaggagtcgcacc**gtg**	30
CMM_2179 (*GTP-binding protein typA/bipA homolog)*	acgctcc**t**gacccggtttgcatcggcacggtaggctggtggtc**G**ctgggaatagc agacggcggctcttcgccctcctcccttgatgacaaggccggcaccctctccactga aggacagcact**atg**	75
CMM_2244 (*transcription elongation factor)*	tgaccgggttgatccacagctgctggcccgcctagagtgggg**A**ttcgcctcgacgg ttccgtcggggcgtccgtgcgagtgcaaggagtccaac**gtg**	48
CMM_2272 (*6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating)*	acgccccgctgacggtcgggggcccgggcgtagcctgatggc**G**actgtcgacaa ggaggcatcag**atg**	23
CMM_2462 (*transcriptional regulator, histone-like protein)*	ctcatggtgtcggatttcccgggggagaacaggtatcgtggctctc**G**ccgcatcatc tgatgcaccatctgcaatgaggaggaacagac**gtg**	42
CMM_2485 (*sugar ABC transporter, ATPase)*	cgtgccggcttcccgaccacagacccgcgtgcaatactcatcgg**G**tggtcgtcgt cgcccacagcgatgagccatgagcatcacatccatcaccacggatcgtcgggca cgtacctgcccgtgaaggagaacaccgaa**atg**	94
CMM_2491 (*conserved secreted protein)*	gcgcccgcgggcggtcgggcgccacccgatcccgtaggctgagc**G**ggtcagct gatccagcgcggacgcctccggacgccccggcgccggcccgcgcgacaaccg gagggtccc**gtg**	65
CMM_2644 (*ATP-dependent helicase)*	ccccgtcggcgagatgggcttctccccggcctgacctgctaaggtggcatc**A**cttg cgagcacatcaccgtgctccctgcgtcgagagaacgcgttccctcctcgccccgat cagatcgccgcacaggccgacggggccga**gtg**	90
CMM_2761 (*hypothetical protein)*	ccaattggatgcatccattgcaatccatgcatgcgtctgtcatcctggtgc**T**ccaccg actgaaggacgcatc**atg**	22
CMM_2776 (*hypothetical protein)*	acaggtgatgcgcatatgaccagggcacggaagatcgtgctagaaaggcgtc**G**t cccacccacccagaggaaggaacggca**atg**	26

Fortsetzung Tabelle 32: Analyse der stromaufwärts liegenden Regionen von 48 Genen.

CMM_2934 (*DNA-binding protein)*	cgagcttccgggcatcacgaagtccagctggtaggttccaagc**G**gccgtacggcc gaacggaccgctgatggcctcttcggctcgcacggtccgctgacgtagacagaccc catccaccacacggccgctcgcgaagaacggcaccaggtccgaggaggacacc c**atg**	122
CMM_2963 (*30S ribosomal protein S6)*	cgcgacccgcggcctggtgcgactcctccccatccggtagtcttgcgaggttgtccgc ccggcaacgggactcccctgccccgcgcggacagatgcacataccctcctgtcgc agatcgtctgcgaccgttcaagtccgaaggaggtgggtta**gtg**	107
CMM_0070 (*subtilisin-like extracellular serine protease)*	gccgatgggggccgtggatccttccctacggttctgccc**A**tcgcctcgacgacgtga ctccgcgactccggccggtgccgtcctgcgcacctcgggctccgcggatccacgag ccggccgcggtcggcgatagaggggaacagcc**atg**	106
CMM_1328 (*conserved secreted protein)*	gcccgacctgtggacggcggccgacgcgcgctcggccgccccgcgagactcctc ag**G**tacttgaaagttcatagaacgggtgggacgcagcgcccgcccgcatcgcacg gaggagcagcgcc**atg**	66
CMM_1447 (*hypothetical protein)*	ccgcggcctgtacggccgcggggcgtcggcgtaccatcggcacg**T**ccgggcgac gaggcccggcgaggagaggcgacgacg**atg**	37
CMM_1925 (*monooxygenase/oxidoreductase)*	ccgcccgattcgcgggaatgccgaccccgccccctacagttgacccg**G**aatgcatac gttcgcatggatcaaggaagcagggcagc**atg**	39
CMM_2077 (*aspartate ammonia-lyase)*	ggcggcctcggcggggcgcggggccgctagtagggtcgagggg**A**tcctcatgcca cgagcgacgagacgatggagcctgcacc**gtg**	37
CMM_2185 (*peptide ABC transporter, SBP)*	ccagtttttgcaaagactcccagccgtacctagggtcattctt**A**tctgcgcggtcgacc gcacgcacggtgggtccgcgccattcccatgcacaggaggaacc**ttg**	50
CMM_2568 (*10 kDa chaperonin, GroES protein)*	actcgcgttgcgcgagtgcaagcgcggcccgtagaatctcacct**G**gcactctcctcg ggagattgccaatcagtcttgtcccttagtcacgaaggaagaggtcaacc**gtg**	63
CMM_2898 (*L-alanine dehydrogenase)*	ctacggagttcacgcgttcgaagcgcacgatggccaccatgggtctc**G**ccctcccg catcgccgccgccggccgcacctcgcggggagacgagacggagcacgc**atg**	57

Tabelle 33: Mittels manueller Analyse identifizierte *leaderless*-Transkripte von 8,5 % der Gene im Genom von *Cmm*382. Aufgelistet sind die Gene, bei denen mittels RNA-Sequenzierung mit Erreichen des Startcodons hohe *read*-Zahlen ermittelt wurden. Die entsprechende COG-Gruppen-Zuordnung ist ebenfalls aufgelistet.

Gen	Mögliche Funktion	COG
CMM_0010 (*ppiA*)	*peptidyl-prolyl cis-trans isomerase*	IV.4
CMM_0012	*conserved membrane protein*	V.2
CMM_0013	*sortase*	II.2
CMM_0022	*conserved membrane protein*	V.2
CMM_0029 (*glsA*)	*glutaminase*	I.2
CMM_0078	*NADH oxidase*	I.1
CMM_0087	*transcriptional regulator, TetR family*	IV.3
CMM_0089 (*catR*)	*transcriptional regulator, LacI family*	IV.3
CMM_0118	*transcriptional regulator, TetR-family*	IV.3
CMM_0131	*N-terminal region of F0F1 ATP synthase subunit B*	V.2
CMM_0144	*conserved secreted protein*	V.2
CMM_0165 (*fhuC*)	*Fe3+-siderophore ABC transporter, ATPase*	IV.1
CMM_0183	*aminotransferase*	I.2
CMM_0210	*putative protein chain release factor B*	III.3
CMM_0213	*conserved hypothetical protein*	V.2
CMM_0238	*bicyclomycin efflux MFS permease*	IV.1
CMM_0241	*membrane protein*	V.2
CMM_0246	*hypothetical protein*	V.2
CMM_0262	*NTP pyrophosphohydrolase*	III.1
CMM_0286	*transcriptional regulator, TetR family*	IV.3
CMM_0321	*oxidoreductase*	V.1
CMM_0381 (*phnF*)	*transcriptional regulator, GntR family*	IV.3
CMM_0384	*transcriptional regulator, Cro/CI family*	IV.3
CMM_0405	*two-component system, sensor kinase*	IV.3
CMM_0413	*hypothetical protein*	V.2
CMM_0414	*transcriptional regulator, MarR family*	IV.3
CMM_0435 (*fepB*)	*iron-siderophore ABC transporter, substrate-binding protein*	IV.1
CMM_0439 (*padA*)	*phenolic acid decarboxylase*	IV.5
CMM_0468	*membrane protein*	V.2
CMM_0475 (*xthB*)	*exonuclease III*	III.1
CMM_0485 (*cpdA*)	*3',5'-cyclic-nucleotide phosphodiesterase*	IV.3

Fortsetzung Tabelle 33: leaderless-*Transkripte der Gene im Genom von* Cmm*382.*

CMM_0487	*membrane protein*	V.2
CMM_0491	*membrane protein*	V.2
CMM_0499	*lysophospholipase*	I.4
CMM_0506	*membrane protein*	V.2
CMM_0507 (*lplA*)	*lipoate-protein ligase A*	I.5
CMM_0508	*acetyltransferase*	V.1
CMM_0513 (*pgmA*)	*phosphoglucomutase*	I.1
CMM_0514 (*pheA*)	*prephenate dehydratase*	I.2
CMM_0515 (*serS*)	*seryl-tRNA synthetase*	III.3
CMM_0530	*oxidoreductase*	V.1
CMM_0544 (*proC*)	*pyrroline-5-carboxylate reductase*	I.2
CMM_0551	*conserved hypothetical protein*	V.2
CMM_0561 (*aspS*)	*aspartyl-tRNA synthetase*	III.3
CMM_0566	*excinuclease ABC, subunit A*	III.1
CMM_0568	*phosphoglycerate mutase*	I.1
CMM_0574	*cytosine-specific DNA methylase*	III.1
CMM_0586 (*hemA*)	*glutamyl-tRNA reductase*	I.5
CMM_0601 (*hemO*)	*heme oxygenase (decyclizing)*	I.5
CMM_0604 (*pfkA*)	*6-phosphofructokinase*	I.1
CMM_0607	*DNA repair protein*	III.1
CMM_0609	*aldose-1-epimerase*	I.1
CMM_0646	*membrane protein*	V.2
CMM_0647	*transcriptional regulator, TetR family*	IV.3
CMM_0656	*conserved hypothetical protein*	V.2
CMM_0659 (*addB*)	*adenosine deaminase*	I.3
CMM_0688	*conserved hypothetical protein*	V.2
CMM_0694	*ATP/GTP binding protein*	V.1
CMM_0701	*hypothetical secreted protein*	V.2
CMM_0709	*stress-induced protein, putative organic hydroperoxide resistance protein*	IV.5
CMM_0736 (*furA*)	*transcriptional regulator, Fur family*	IV.3
CMM_0741	*conserved membrane protein*	IV.1
CMM_0758 (*purM*)	*phosphoribosylformylglycinamidine cyclo-ligase*	I.3
CMM_0761	*amino acid permease, APC family*	IV.1
CMM_0765	*glycogen debranching enzyme*	I.1
CMM_0767	*hypothetical secreted protein*	V.2
CMM_0811	*proline racemase*	I.2
CMM_0817 (*pipB*)	*proline iminopeptidase*	I.2
CMM_0828	*hypothetical protein*	II.2
CMM_0856	*conserved hypothetical protein*	V.2
CMM_0894	*nucleoside-diphosphate-sugar epimerase*	I.1
CMM_0895 (*ptaA*)	*phosphate acetyltransferase*	I.1
CMM_0904 (*mqo*)	*malate:quinone oxidoreductase*	I.1
CMM_0905	*conserved hypothetical protein, putative DNA repair photolyase*	III.1
CMM_0913	*conserved membrane protein, putative resistance protein*	V.2
CMM_0915 (*pbpC*)	*penicillin-binding protein*	II.2
CMM_0919 (*pbpD*)	*penicillin-binding protein*	II.2
CMM_0950	*conserved hypothetical protein*	V.2
CMM_0974 (*manC*)	*mannose-1-phosphate guanylyltransferase*	I.1
CMM_0989 (*punA*)	*purine nucleoside phosphorylase*	I.3
CMM_0990 (*lpdA*)	*dihydrolipoamide dehydrogenase*	I.1
CMM_0991 (*accA*)	*acetyl/propionyl-CoA carboxylase subunit*	I.4
CMM_1001	*hypothetical membrane protein*	V.2
CMM_1011 (*wcqC*)	*conserved hypothetical protein, putative sugar translocase*	II.2
CMM_1012 (*rmlC*)	*dTDP-4-dehydrorhamnose 3,5-epimerase*	II.2
CMM_1032	*conserved hypothetical protein*	V.2
CMM_1043	*transcriptional regulator, TetR family*	IV.3
CMM_1048	*conserved membrane protein*	V.2
CMM_1059	*two-component system, sensor kinase*	IV.3
CMM_1064	*hypothetical protein*	V.2
CMM_1067 (*ansP*)	*L-asparagine permease, APC family*	IV.1
CMM_1074 (*zwfB*)	*glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase*	I.1
CMM_1083	*sugar phosphate isomerase/epimerase*	I.1
CMM_1093 (*ilvD*)	*dihydroxy-acid dehydratase*	I.2
CMM_1099	*conserved membrane protein*	V.2

Fortsetzung Tabelle 33: leaderless-*Transkripte der Gene im Genom von* Cmm*382.*

CMM_1106	*putative fumarylacetoacetate hydrolase*	V.2
CMM_1112	*potassium channel protein, beta subunit*	IV.1
CMM_1113	*potassium channel protein alpha subunit*	IV.1
CMM_1114	*transcriptional regulator, TetR family*	IV.3
CMM_1118	*Zn-dependent hydrolase*	V.1
CMM_1121	*acetyltransferase*	V.1
CMM_1127	*Asp/Glu-tRNA amidotransferase*	III.3
CMM_1129	*siderophore-interacting protein*	I.6
CMM_1135	*F420-dependent NADP reductase*	V.1
CMM_1140	*pyridoxamine-phosphate oxidase*	I.5
CMM_1150 (*argS*)	*arginyl-tRNA synthetase*	III.3
CMM_1174	*transcriptional regulator, AsnC family*	IV.3
CMM_1178 (*dapE*)	*succinyl-diaminopimelate desuccinylase*	I.2
CMM_1182 (*tatB*)	*Sec-independent twin-arginine protein translocase protein*	IV.2
CMM_1187	*Mg2+ transporter, MgtE family*	IV.1
CMM_1188	*conserved membrane protein*	V.2
CMM_1191	*conserved hypothetical protein, putative phosphoesterase*	V.2
CMM_1209 (*lipB*)	*octanoyltransferase (lipoate-protein ligase B)*	I.5
CMM_1219	*transcriptional regulator, TetR family*	IV.3
CMM_1220	*carboxylesterase*	V.1
CMM_1223	*acetyltransferase*	V.1
CMM_1225	*ATP-dependent RNA helicase*	III.1
CMM_1236	*hypothetical protein*	V.2
CMM_1239	*multidrug ABC transporter, ATPase*	IV.1
CMM_1256	*Zn-dependent alcohol dehydrogenase*	V.1
CMM_1283	*conserved membrane protein*	V.2
CMM_1291	*conserved hypothetical protein*	V.2
CMM_1294 (*murI*)	*glutamate racemase*	II.2
CMM_1297 (*czcD*)	*cobalt-zinc-cadmium efflux permease, CDF family*	IV.1
CMM_1323 (*guaB*)	*inosine monophosphate dehydrogenase*	I.3
CMM_1337	*oxidoreductase*	V.1
CMM_1371 (*mapA1*)	*methionine aminopeptidase*	III.3
CMM_1376	*conserved hypothetical protein*	V.2
CMM_1402 (*csdA*)	*cysteine desulfurase*	I.5
CMM_1403 (*trmU*)	*tRNA-specific 2-thiouridylase*	III.3
CMM_1411	*conserved secreted protein*	V.2
CMM_1433	*conserved hypothetical protein*	V.2
CMM_1440 (*ornA*)	*oligoribonuclease*	III.2
CMM_1443 (*nadE*)	*NH(3)-dependent NAD(+) synthetase*	I.5
CMM_1444	*hypothetical protein*	V.2
CMM_1451	*ABC transporter, ATPase*	IV.1
CMM_1458	*conserved hypothetical protein*	V.2
CMM_1469	*methylase*	V.1
CMM_1507	*ATP-dependent helicase*	III.1
CMM_1519 (*zwfA1*)	*glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase*	I.1
CMM_1559	*conserved hypothetical protein*	V.2
CMM_1567	*hydrolase, HIT family*	V.1
CMM_1572	*two-component system, sensor kinase*	IV.3
CMM_1586 (*dnaG*)	*DNA primase*	III.1
CMM_1596 (*wcmE*)	*conserved membrane protein, putative transporter, DMT family*	IV.1
CMM_1601 (*wcmH*)	*glycosyltransferase*	II.2
CMM_1619 (*fabD*)	*malonyl CoA-acyl carrier protein transacylase*	I.4
CMM_1624	*transcriptional regulator, TetR family*	IV.3
CMM_1631 (*ppgK1*)	*polyphosphate glucokinase, ROK family*	I.1
CMM_1632	*conserved hypothetical protein*	V.2
CMM_1639	*conserved membrane protein*	V.2
CMM_1644	*conserved hypothetical protein*	V.2
CMM_1656 (*dutA*)	*deoxyuridine 5'-triphosphate pyrophosphatase*	I.3
CMM_1664	*conserved hypothetical protein*	V.2
CMM_1713	*hydrolase*	V.1
CMM_1718	*glycosyltransferase*	II.2
CMM_1719 (*glgC*)	*glucose-1-phosphate adenylyltransferase*	I.1
CMM_1755 (*polA1*)	*DNA polymerase I*	III.1
CMM_1757	*response regulator involved in antitermination*	IV.3
CMM_1771 (*hisE*)	*phosphoribosyl-ATP pyrophosphatase*	I.2

Fortsetzung Tabelle 33: leaderless-*Transkripte der Gene im Genom von* Cmm*382.*

CMM_1772	*peptidyl-prolyl cis-trans isomerase*	IV.4
CMM_1794 (*aroQ*)	*3-dehydroquinate dehydratase*	I.2
CMM_1824	*peroxidase*	IV.5
CMM_1834 (*ctaE*)	*cytochrome c oxidase subunit III*	I.1
CMM_1848 (*hisD*)	*histidinol dehydrogenase*	I.2
CMM_1871	*conserved hypothetical protein, putative DNA-binding protein*	V.2
CMM_1874 (*aroG*)	*phospho-2-dehydro-3-deoxyheptonate aldolase*	I.2
CMM_1881	*ATPase*	II.1
CMM_1898	*hypothetical protein*	V.2
CMM_1902	*conserved secreted protein, putative amine oxidase*	V.2
CMM_1905	*hypothetical protein*	V.2
CMM_1906	*hypothetical protein*	V.2
CMM_1907	*hypothetical protein*	V.2
CMM_1929	*quinone oxidoreductase*	I.1
CMM_1932	*acyl-CoA synthetase*	I.4
CMM_1983 (*pyrG*)	*CTP synthase*	I.3
CMM_2007 (*gluA*)	*glutamate ABC transporter, ATPase*	IV.1
CMM_2016 (*hisB*)	*imidazoleglycerol-phosphate dehydratase*	I.2
CMM_2019 (*hflX*)	*GTP-binding protein, obg family*	III.3
CMM_2020	*rRNA methylase*	III.3
CMM_2035 (*dapA*)	*dihydrodipicolinate synthase*	I.2
CMM_2040 (*dapB*)	*dihydrodipicolinate reductase*	I.2
CMM_2042 (*pepR*)	*metallopeptidase, M16 family*	IV.7
CMM_2057	*2,5-diketo-D-gluconic acid reductase*	I.1
CMM_2071	*FAD/FMN-containing dehydrogenase*	V.1
CMM_2075	*hydrolase*	V.1
CMM_2075A	*hypothetical protein*	V.2
CMM_2076	*hypothetical protein*	V.2
CMM_2078	*conserved hypothetical protein, putative nuclease*	V.2
CMM_2086	*conserved hypothetical protein*	V.2
CMM_2095A	*hypothetical protein*	V.2
CMM_2114 (*ptrB*)	*protease II (oligopeptidase B)*	IV.7
CMM_2121	*glutathione S-transferase*	IV.5
CMM_2135	*putative nucleoside-diphosphate-sugar epimerase*	I.3
CMM_2139 (*cynX*)	*MFS permease, CynX family*	IV.1
CMM_2140	*conserved hypothetical protein*	V.2
CMM_2144 (*truB*)	*tRNA pseudouridine synthase B*	III.3
CMM_2147 (*mutY*)	*A/G-specific adenine glycosylase*	III.1
CMM_2152 (*proS*)	*prolyl-tRNA synthetase*	III.3
CMM_2156 (*ispG*)	*4-hydroxy-3-methylbut-2-en-1-yl diphosphate synthase*	I.4
CMM_2157	*Zn metalloprotease, family M50*	IV.7
CMM_2198	*conserved hypothetical protein*	V.2
CMM_2200	*copper resistance protein*	IV.5
CMM_2218	*phosphatase*	V.2
CMM_2219	*conserved hypothetical protein*	V.2
CMM_2223	*GTP-binding protein, obg family*	III.3
CMM_2248	*conserved membrane protein*	V.2
CMM_2266	*pyrophosphatase*	I.6
CMM_2276	*transcriptional regulator, MarR family*	IV.3
CMM_2285	*ABC transporter, duplicated ATPase*	IV.1
CMM_2296	*hypothetical protein*	V.2
CMM_2316	*conserved hypothetical protein, putative phosphomutase/lyase*	V.2
CMM_2341	*hypothetical membrane protein*	V.2
CMM_2367 (*ispE*)	*4-diphosphocytidyl-2-C-methyl-D-erythritol kinase*	I.4
CMM_2369	*DNase*	III.1
CMM_2373	*NAD(P)H oxidoreductase*	V.1
CMM_2398	*dolichyl-phosphate-mannose-protein mannosyltransferase*	I.4
CMM_2400	*O-acetylhomoserine (thiol)-lyase*	I.2
CMM_2405 (*sdaA*)	*L-serine dehydratase*	I.2
CMM_2430	*MFS permease*	IV.1
CMM_2432	*aldo/keto reductase*	V.1
CMM_2440	*conserved hypothetical protein*	V.2
CMM_2446 (*galU*)	*UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase*	I.1
CMM_2447	*5-formyltetrahydrofolate cyclo-ligase*	I.5
CMM_2452	*transcriptional regulator, Cro/CI family, nucleotidyltransferase*	IV.3

Fortsetzung Tabelle 33: leaderless-*Transkripte der Gene im Genom von* Cmm*382.*

CMM_2469 (*serC*)	*phosphoserine aminotransferase*	I.2
CMM_2472	*hypothetical membrane protein*	V.2
CMM_2475	*two-component system, response regulator*	IV.3
CMM_2493	*two-component system, sensor kinase*	IV.3
CMM_2495 (*pgmA*)	*2,3-bisphosphoglycerate-dependent phosphoglycerate mutase*	I.1
CMM_2496	*methylase*	V.1
CMM_2511	*conserved hypothetical protein*	V.2
CMM_2515	*hypothetical protein*	V.2
CMM_2516	*aldose-1-epimerase*	I.1
CMM_2518 (*galT*)	*galactose-1-phosphate uridylyltransferase*	I.1
CMM_2534	*ABC transporter ATPase*	IV.1
CMM_2555	*conserved membrane protein*	V.2
CMM_2559 (*guaB1*)	*inosine-5'-monophosphate dehydrogenase*	I.3
CMM_2572	*conserved hypothetical protein, putative metalloprotease*	V.2
CMM_2625	*hypothetical membrane protein*	V.2
CMM_2633	*conserved hypothetical protein, putative polyamine synthase*	V.2
CMM_2645	*transcriptional regulator, TetR family*	IV.3
CMM_2646	*conserved hypothetical protein*	V.2
CMM_2745	*putative F420-dependent NADP reductase*	V.2
CMM_2757	*hypothetical membrane protein*	V.2
CMM_2790 (*aspC*)	*aspartate aminotransferase*	I.2
CMM_2795	*hypothetical protein*	V.2
CMM_2797 (*aglC*)	*alpha-glucosidase, glycosyl hydrolase family 13*	I.1
CMM_2808 (*menH*)	*menaquinone biosynthesis methyltransferase*	I.5
CMM_2810 (*menF*)	*isochorismate synthase*	I.5
CMM_2813	*hypothetical membrane protein*	V.2
CMM_2814	*conserved membrane protein*	V.2
CMM_2858	*conserved membrane protein, putative protein-S-isoprenylcysteine methyltransferase*	V.2
CMM_2865	*conserved hypothetical protein, putative nuclease*	V.2
CMM_2870	*hypothetical protein*	V.2
CMM_2874	*conserved hypothetical protein, putative RNA-binding regulator*	V.2
CMM_2880	*conserved hypothetical protein*	V.2
CMM_2913	*oxidoreductase*	V.1
CMM_2918	*hypothetical protein*	V.2
CMM_2926	*conserved secreted protein*	V.2
CMM_2930 (*fecC2*)	*iron-siderophore ABC transporter, permease component*	IV.1
CMM_2944	*2-keto acid dehydrogenase, E1 beta component*	I.1
CMM_2945 (*hisC2*)	*histidinol-phosphate aminotransferase 2*	I.2
CMM_2946	*conserved membrane protein*	V.2
CMM_2955	*glycosyltransferase*	II.2
CMM_2957 (*prfC*)	*peptide chain release factor 3*	III.3
CMM_2964 (*pcnA*)	*RNA nucleotidyltransferase*	III.3
CMM_2965	*conserved secreted protein*	V.2
CMM_PS_19	*hypothetical protein*	V.2

Tabelle 34: Mittels manueller Analyse identifizierte Transkripte, die hohe interne *reads* im offenen Leserahmen der Gene im Genom von *Cmm*382 zeigten. Aufgelistet sind die Gene, bei denen mittels RNA-Sequenzierung hohe *read*-Zahlen im offenen Leserahmen identifiziert wurden. Die entsprechende COG-Gruppen-Zuordnung ist ebenfalls aufgelistet.

Gen	Mögliche Funktion	COG
CMM_0728 (*purL*)	*phosphoribosylformylglycinamidine synthase II*	I.3
CMM_0736 (*furA*)	*transcriptional regulator, Fur family*	IV.3
CMM_0753 (*purC*)	*phosphoribosylaminoimidazole-succinocarboxamide synthase*	I.3
CMM_0757 (*purF*)	*amidophosphoribosyltransferase*	I.3
CMM_0792	*sugar ABC transporter, substrate-binding protein*	IV.1
CMM_0828	*hypothetical protein*	II.2
CMM_0839	*membrane bound metalloprotease*	IV.7
CMM_0840	*NPL/P60 family secreted protein*	IV.6
CMM_0841 (*ipyA*)	*inorganic pyrophosphatase*	I.6
CMM_0844 (*ftsH*)	*cell division protein, membrane-bound ATP-dependent protease*	II.1
CMM_0857 (*clpC*)	*ATP-dependent protease, ATPase subunit*	IV.4

Fortsetzung Tabelle 34: Transkripte der Gene im Genom von Cmm*382 mit internen* reads.

CMM_0860 (*rplJ*)	*50S ribosomal protein L10*	III.3
CMM_0866	*alpha-glucoside ABC transporter, substrate-binding protein*	IV.1
CMM_0867	*alpha-glucoside ABC transporter, permease component*	IV.1
CMM_0871	*conserved hypothetical protein*	V.2
CMM_0872 (*cysB*)	*cystathionine beta-synthase*	I.2
CMM_0877 (*araD*)	*L-ribulose-5-phosphate 4-epimerase*	I.1
CMM_0878 (*araA*)	*L-arabinose isomerase*	I.1
CMM_0879	*sugar ABC transporter, substrate-binding protein*	IV.1
CMM_0880	*sugar ABC transporter, ATPase*	IV.1
CMM_0902 (*lysC*)	*aspartokinase*	I.2
CMM_0904 (*mqo*)	*malate:quinone oxidoreductase*	I.1
CMM_0919 (*pbpD*)	*penicillin-binding protein*	II.2
CMM_0927 (*topA*)	*DNA topoisomerase*	III.1
CMM_0966 (*xthA*)	*exonuclease III*	III.1
CMM_0970 (*sdhA*)	*succinate dehydrogenase flavoprotein subunit*	I.1
CMM_0976	*ABC transporter, substrate-binding protein*	IV.1
CMM_0983 (*addA*)	*adenosine deaminase*	I.3
CMM_0991 (*accA*)	*acetyl/propionyl-CoA carboxylase subunit*	I.4
CMM_0999 (*accD*)	*acetyl/propionyl-CoA carboxylase, beta chain*	I.4
CMM_1038 (*ahcY*)	*adenosylhomocysteinase*	I.5
CMM_1054 (*secA*)	*protein translocase subunit SecA*	IV.2
CMM_1062 (*bcp*)	*alkyl hydroperoxide reductase*	IV.5
CMM_1094 (*ilvB*)	*acetolactate synthase*	I.2
CMM_1095 (*ilvH*)	*acetolactate synthase, small (regulatory) subunit*	I.2
CMM_1096 (*ilvC*)	*ketol-acid reductoisomerase*	I.2
CMM_1100 (*serA*)	*D-3-phosphoglycerate dehydrogenase*	I.2
CMM_1129	*siderophore-interacting protein*	I.6
CMM_1153 (*thrA*)	*homoserine dehydrogenase*	I.2
CMM_1156 (*rhoA*)	*transcription termination factor*	III.2
CMM_1157 (*prfA*)	*peptide chain release factor 1 (RF-1)*	III.3
CMM_1163 (*atpB*)	*ATP synthase, A chain*	IV.1
CMM_1164 (*atpE*)	*ATP synthase, C chain*	IV.1
CMM_1165 (*atpF*)	*ATP synthase, subunit b (F-type ATPase, subunit b)*	IV.1
CMM_1166 (*atpH*)	*ATP synthase delta chain*	IV.1
CMM_1167 (*atpA*)	*ATP synthase, subunit alpha (F-ATPase subunit alpha)*	IV.1
CMM_1168 (*atpG*)	*ATP synthase, gamma chain (F-ATPase gamma subunit)*	IV.1
CMM_1169 (*atpD*)	*ATP synthase, subunit beta (F-ATPase subunit beta)*	IV.1
CMM_1170 (*atpC*)	*ATP synthase, epsilon chain*	IV.1
CMM_1204	*conserved membrane protein*	V.2
CMM_1207	*transcriptional regulator, PadR family*	IV.3
CMM_1208 (*lipA*)	*lipoyl synthase*	I.5
CMM_1225	*ATP-dependent RNA helicase*	III.1
CMM_1255	*fatty acid desaturase*	I.4
CMM_1278	*serine protease, family S1B*	IV.7
CMM_1282	*CDP-glycerol:poly (Glycerophosphate) glycerophosphotransferase*	II.2
CMM_1286	*polysaccharide/polyol phosphate ABC transporter, ATPase*	IV.1
CMM_1287	*polysaccharide/polyol phosphate ABC transporter, permease component*	IV.1
CMM_1288	*sugar nucleotidyltransferase*	II.2
CMM_1295 (*rphA*)	*ribonuclease PH (TRNA nucleotidyltransferase)*	III.2
CMM_1308 (*prfB*)	*peptide chain release factor RF-2*	III.3
CMM_1322 (*sucA*)	*2-oxoglutarate dehydrogenase, E1 component*	I.1
CMM_1342 (*leuD*)	*3-isopropylmalate dehydratase. small subunit*	I.2
CMM_1345 (*gpsA*)	*glycerol-3-phosphate dehydrogenase*	I.1
CMM_1356	*conserved hypothetical protein*	V.2
CMM_1367 (*rpsP*)	*30S ribosomal protein S16*	III.3
CMM_1373 (*rplS*)	*50S ribosomal protein L19*	III.3
CMM_1383 (*rpsB*)	*30S ribosomal protein S2*	III.3
CMM_1384 (*tsf*)	*elongation factor Ts (EF-Ts)*	III.3
CMM_1385 (*pyrH*)	*uridylate kinase*	I.3
CMM_1386 (*frr*)	*ribosome-recycling factor (ribosome-releasing factor)*	III.3
CMM_1408 (*gatA*)	*glutamyl-tRNA (Gln) amidotransferase, subunit A*	III.3
CMM_1409 (*gatB*)	*aspartyl/glutamyl-tRNA (Asn/Gln) amidotransferase, subunit B*	III.3
CMM_1410	*ABC transporter ATPase*	IV.1
CMM_1463 (*tig*)	*trigger factor (prolyl isomerase; chaperone)*	IV.4

Fortsetzung Tabelle 34: Transkripte der Gene im Genom von Cmm*382 mit internen* reads.

CMM_1464 (*clpP1*)	*ATP-dependent Clp protease, proteolytic subunit*	IV.4
CMM_1465 (*clpP2*)	*ATP-dependent Clp protease, proteolytic subunit*	IV.4
CMM_1466	*monooxygenase*	V.1
CMM_1467 (*clpX*)	*ATP-dependent Clp protease, ATP-binding subunit clpX*	IV.4
CMM_1489 (*rplU*)	*50S ribosomal protein L21*	III.3
CMM_1494	*hypothetical membrane protein*	V.2
CMM_1495 (*nadD*)	*nicotinate-nucleotide adenylyltransferase*	I.5
CMM_1497	*conserved hypothetical protein*	V.2
CMM_1498	*conserved hypothetical protein*	V.2
CMM_1555 (*lepA*)	*GTP-binding protein*	III.3
CMM_1568	*phosphate starvation-induced ATPase*	V.1
CMM_1576 (*leuA*)	*2-isopropylmalate synthase*	I.2
CMM_1611 (*cspA1*)	*cold shock protein*	IV.4
CMM_1617 (*acpP*)	*acyl carrier protein*	I.4
CMM_1618 (*fabH*)	*3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase III*	I.4
CMM_1619 (*fabD*)	*malonyl CoA-acyl carrier protein transacylase*	I.4
CMM_1621 (*aceE*)	*pyruvate dehydrogenase, E1 component*	I.1
CMM_1630	*conserved hypothetical protein, putative Zn-ribbon protein*	IV.3
CMM_1636 (*glnA1*)	*glutamine synthetase I*	I.2
CMM_1642 (*lpdB*)	*dihydrolipoyl dehydrogenase*	I.1
CMM_1649	*conserved hypothetical protein*	V.2
CMM_1653	*putative transcriptional regulator*	IV.3
CMM_1675	*hypothetical secreted protein*	V.2
CMM_1682 (*glpQ2*)	*glycerophosphoryl diester phosphodiesterase*	I.4
CMM_1683	*conserved hypothetical protein*	V.2
CMM_1714	*trehalose synthase*	I.1
CMM_1716 (*rpmE2*)	*50S ribosomal protein L31, type B*	III.3
CMM_1728	*ABC transporter, ATPase*	IV.1
CMM_1729	*2Fe-2S ferredoxin*	IV.5
CMM_1730	*putative Fe-S cluster assembly protein, ABC transporter*	IV.5
CMM_1731	*putative Fe-S cluster assembly protein, ABC transporter*	IV.5
CMM_1734 (*tktA*)	*transketolase*	I.1
CMM_1737 (*zwfA2*)	*glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase*	I.1
CMM_1740	*conserved hypothetical protein*	V.2
CMM_1741 (*secG*)	*protein-export membrane protein*	IV.2
CMM_1744 (*gapA*)	*glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*	I.1
CMM_1745 (*sodA*)	*superoxide dismutase*	IV.5
CMM_1752 (*rpsA*)	*30S ribosomal protein S1*	III.3
CMM_1759 (*gltD*)	*glutamate synthase (NADPH), beta subunit*	I.2
CMM_1763 (*trpB*)	*tryptophan synthase, beta chain*	I.2
CMM_1764 (*trpC*)	*indole-3-glycerol phosphate synthase*	I.2
CMM_1765	*membrane protein*	I.2
CMM_1780 (*gmkA*)	*guanylate kinase (GMP kinase)/integration host factor (IHF) fusion protein*	I.3
CMM_1793 (*efp*)	*elongation factor P (EF-P)*	III.3
CMM_1804 (*rpsD*)	*30S ribosomal protein S4*	III.3
CMM_1807	*conserved hypothetical protein, putative ATPase*	V.2
CMM_1808	*conserved hypothetical protein*	V.2
CMM_1809 (*relA*)	*GTP pyrophosphokinase*	IV.3
CMM_1819	*conserved protein, putatively involved in pyridoxine biosynthesis*	I.5
CMM_1820	*conserved hypothetical protein, HIT family hydrolase*	V.2
CMM_1821 (*thrS*)	*threonyl-tRNA synthetase*	III.3
CMM_1830 (*glpF*)	*glycerol uptake facilitator protein, MIP family*	IV.1
CMM_1831 (*glpK*)	*glycerol kinase*	IV.1
CMM_1834 (*ctaE*)	*cytochrome c oxidase subunit III*	I.1
CMM_1835 (*qcrC*)	*ubiquinol-cytochrome c reductase, cytochrome c subunit*	I.1
CMM_1836 (*qcrA*)	*menaquinol-cytochrome C reductase, iron-sulfur subunit*	I.1
CMM_1839	*acetyltransferase*	V.1
CMM_1840	*conserved membrane protein*	I.1
CMM_1841 (*ctaD*)	*cytochrome c oxidase, subunit I*	I.1
CMM_1842 (*ctaC*)	*cytochrome c oxidase, subunit 2*	I.1
CMM_1863 (*murF*)	*UDP-N-acetylmuramoyl-tripeptide--D-alanyl-D-alanine ligase*	II.2
CMM_1909 (*cpsY*)	*UDP-glucose 4-epimerase*	I.1
CMM_1941	*conserved membrane protein*	V.2
CMM_1952 (*betT*)	*high-affinity choline/glycine/betaine transport protein, BCCT family*	IV.1

Fortsetzung Tabelle 34: Transkripte der Gene im Genom von Cmm*382 mit internen* reads.

CMM_1966 (*clvK*)	*two-component system, sensor kinase*	IV.3
CMM_1971	*hydrolase or DNA-binding competence protein*	V.2
CMM_1975 (*cmkA*)	*cytidylate kinase*	I.3
CMM_1996 (*argG*)	*argininosuccinate synthase (citrulline-aspartate ligase)*	I.2
CMM_2009 (*rplT*)	*50S ribosomal protein L20*	III.3
CMM_2010 (*rpmI*)	*50S ribosomal protein L35*	III.3
CMM_2011 (*infC*)	*translation initiation factor IF-3*	III.3
CMM_2047 (*pnp*)	*polyribonucleotide nucleotidyltransferase*	III.3
CMM_2069	*conserved hypothetical protein*	V.2
CMM_2073	*conserved hypothetical protein, Ku-homolog*	III.1
CMM_2093 (*alcBC*)	*siderophore biosynthesis protein*	I.6
CMM_2096	*hypothetical protein*	V.2
CMM_2097	*hypothetical protein*	V.2
CMM_2107	*sugar ABC transporter, permease component*	IV.1
CMM_2109 (*lacZ*)	*beta-galactosidase*	I.1
CMM_2149 (*infB*)	*translation initiation factor IF-2*	III.3
CMM_2150	*nucleic-acid-binding protein*	V.1
CMM_2155	*3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase*	I.4
CMM_2156 (*ilpG*)	*4-hydroxy-3-methylbut-2-en-1-yl diphosphate synthase*	I.4
CMM_2163 (*gabT*)	*4-aminobutyrate aminotransferase*	I.2
CMM_2176	*conserved secreted lipoprotein*	IV.1
CMM_2177	*putative Fe-dependent peroxidase*	IV.1
CMM_2179 (*bipA*)	*GTP-binding protein typA/bipA homolog*	III.3
CMM_2181	*peptide ABC transporter, ATPase*	IV.1
CMM_2182	*conserved membrane protein*	V.2
CMM_2183	*peptide ABC transporter, permease component*	IV.1
CMM_2184	*peptide ABC transporter, permease component*	IV.1
CMM_2185	*peptide ABC transporter, substrate-binding protein*	IV.1
CMM_2201	*cysteine desulfurase*	I.5
CMM_2215	*hypothetical secreted protein, peptidoglycan-binding*	V.2
CMM_2221	*hypothetical secreted protein, putative pilin*	V.2
CMM_2222	*conserved hypothetical protein*	V.2
CMM_2231	*conserved hypothetical protein*	V.2
CMM_2243	*conserved hypothetical protein*	V.2
CMM_2244 (*greA*)	*transcription elongation factor*	III.2
CMM_2259	*NADH dehydrogenase*	I.1
CMM_2263 (*eno*)	*enolase (2-phosphoglycerate dehydratase)*	I.1
CMM_2270 (*rplY*)	*50S ribosomal protein L25*	III.3
CMM_2275 (*glmU*)	*UDP-N-acetylglucosamine pyrophosphorylase*	II.2
CMM_2283	*metal ABC transporter, substrate-binding protein*	IV.1
CMM_2292	*hypothetical protein*	V.2
CMM_2370 (*metS*)	*methionyl-tRNA synthetase*	III.3
CMM_2380 (*prpD*)	*2-methylcitrate dehydratase*	I.1
CMM_2401	*conserved hypothetical protein, CoA-binding*	V.2
CMM_2428 (*nrdB*)	*ribonucleoside-diphosphate reductase, beta subunit*	I.3
CMM_2429 (*nrdA*)	*ribonucleoside-diphosphate reductase*	I.3
CMM_2471 (*cspB*)	*cold shock protein*	IV.4
CMM_2478 (*groEL*)	*60 kDa chaperonin (protein Cpn60) (GroEL protein)*	IV.4
CMM_2490	*transcriptional regulator, CarD family*	IV.3
CMM_2503 (*ppkA*)	*polyphosphate kinase*	I.1
CMM_2510 (*sigK*)	*RNA polymerase sigma factor, ECF subfamily*	IV.3
CMM_2532 (*purU*)	*formyltetrahydrofolate deformylase*	I.3
CMM_2537 (*icdA*)	*isocitrate dehydrogenase*	I.1
CMM_2547 (*sucD*)	*succinyl-CoA ligase [ADP-forming], subunit alpha*	I.1
CMM_2554 (*guaA*)	*GMP synthase*	I.3
CMM_2555	*conserved membrane protein*	V.2
CMM_2562 (*livH*)	*branched-chain amino acid ABC transporter, permease protein*	IV.1
CMM_2563 (*livM*)	*branched-chain amino acid ABC transporter, permease component*	IV.1
CMM_2566 (*livK*)	*branched-chain amino acid ABC transporter, SBP*	IV.1
CMM_2568 (*groES*)	*10 kDa chaperonin (protein Cpn10) (GroES protein)*	IV.4
CMM_2579 (*rpsI*)	*30S ribosomal protein S9*	III.3
CMM_2580 (*rplM*)	*50S ribosomal protein L13*	III.3
CMM_2583 (*rplQ*)	*50S ribosomal protein L17*	III.3
CMM_2584 (*rpoA*)	*DNA-directed RNA polymerase, subunit alpha*	III.2
CMM_2585 (*rpsK*)	*30S ribosomal protein S11*	III.3

Fortsetzung Tabelle 34: Transkripte der Gene im Genom von Cmm*382 mit internen* reads.

CMM_2586 (*rpsM*)	*30S ribosomal protein S13*	III.3
CMM_2587 (*rpmJ1*)	*50S ribosomal protein L36*	III.3
CMM_2588 (*infA*)	*translation initiation factor IF-1*	III.3
CMM_2596 (*mapA2*)	*methionine aminopeptidase*	III.3
CMM_2597 (*adkA*)	*adenylate kinase*	I.3
CMM_2598 (*secY*)	*preprotein translocase, subunit secY*	IV.2
CMM_2599 (*rplO*)	*50S ribosomal protein L15*	III.3
CMM_2600 (*rpmD*)	*50S ribosomal protein L30*	III.3
CMM_2601 (*rpsE*)	*30S ribosomal protein S5*	III.3
CMM_2602 (*rplR*)	*50S ribosomal protein L18*	III.3
CMM_2603 (*rplF*)	*50S ribosomal protein L6*	III.3
CMM_2604 (*rpsH*)	*30S ribosomal protein S8*	III.3
CMM_2605 (*rplE*)	*50S ribosomal protein L5*	III.3
CMM_2606 (*rplX*)	*50S ribosomal protein L24*	III.3
CMM_2607 (*rplN*)	*50S ribosomal protein L14*	III.3
CMM_2608 (*rpsQ*)	*30S ribosomal protein S17*	III.3
CMM_2609 (*rpmC*)	*50S ribosomal protein L29*	III.3
CMM_2610 (*rplP*)	*50S ribosomal protein L16*	III.3
CMM_2611 (*rpsC*)	*30S ribosomal protein S3*	III.3
CMM_2612 (*rplV*)	*50S ribosomal protein L22*	III.3
CMM_2613 (*rpsS*)	*30S ribosomal protein S19*	III.3
CMM_2614 (*rplB*)	*50S ribosomal protein L2*	III.3
CMM_2615 (*rplW*)	*50S ribosomal protein L23*	III.3
CMM_2616 (*rplD*)	*50S ribosomal protein L4*	III.3
CMM_2617 (*rplC*)	*50S ribosomal protein L3*	III.3
CMM_2618 (*rpsJ*)	*30S ribosomal protein S10*	III.3
CMM_2620 (*tuf*)	*elongation factor Tu (EF-Tu)*	III.3
CMM_2621 (*fusA*)	*elongation factor G (EF-G)*	III.3
CMM_2622 (*rpsG*)	*30S ribosomal protein S7*	III.3
CMM_2623 (*rpsL*)	*30S ribosomal protein S12*	III.3
CMM_2630 (*rpoC*)	*DNA-directed RNA polymerase, subunit beta*	III.2
CMM_2631 (*rpoB*)	*DNA-directed RNA polymerase, subunit beta*	III.2
CMM_2644	*ATP-dependent helicase*	III.1
CMM_2688	*acetyl xylan esterase*	I.1
CMM_2689	*hypothetical protein*	V.2
CMM_2706	*conserved hypothetical protein, putative toxin of kil/kor system*	II.1
CMM_2707	*hypothetical protein*	V.2
CMM_2713	*hypothetical membrane protein*	V.2
CMM_2714	*conserved secreted protein*	V.2
CMM_2744	*conserved hypothetical protein*	V.2
CMM_2773	*conserved hypothetical protein, putative nitroreductase*	V.2
CMM_2774	*conserved hypothetical protein*	V.2
CMM_2775	*conserved hypothetical protein*	V.2
CMM_2786 (*rplA*)	*50S ribosomal protein L1*	III.3
CMM_2787 (*rplK*)	*50S ribosomal protein L11*	III.3
CMM_2788 (*nusG*)	*transcription antitermination protein*	III.2
CMM_2789 (*secE*)	*preprotein translocase subunit*	IV.2
CMM_2808 (*menH*)	*menaquinone biosynthesis methyltransferase*	I.5
CMM_2846	*plasmid maintenance system, antidote protein*	II.1
CMM_2847	*plasmid maintemance system, killer protein*	II.1
CMM_2895	*conserved hypothetical protein*	V.2
CMM_2901	*hypothetical protein*	V.2
CMM_2935 (*rpsN*)	*30S ribosomal protein S14*	III.3
CMM_2936 (*rpmG*)	*50S ribosomal protein L33*	III.3
CMM_2937 (*rpmB*)	*50S ribosomal protein L28*	III.3
CMM_2950 (*purB*)	*adenylosuccinate lyase*	I.3
CMM_2962 (*ssb*)	*sSingle-stranded DNA-binding protein*	III.1
CMM_2963 (*rpsF*)	*30S ribosomal protein S6*	III.3
CMM_2968 (*trxA*)	*thioredoxin reductase*	IV.5
CMM_2975	*conserved membrane protein*	V.2
CMM_2976	*conserved hypothetical protein*	V.2
CMM_2977 (*rnpA*)	*ribonuclease P, protein component*	III.2
CMM_2978 (*rpmH*)	*50S ribosomal protein L34*	III.3
CMM_PS_20	*CMM_PS_20*	V.2

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat
BSA	bovines Serumalbumin
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
cfu	*colony forming units*
COG	*cluster of orthologous groups*
CSPD	*Disodium 3-(4-methoxyspiro {1,2-dioxetane-3,2'-(5'-chloro)tricyclo-[3.3.1.1^{3,7}]decan}-4-yl)phenyl phosphate*
Da	Dalton
DIG	Digoxigenin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (*deoxyribonucleic acid*)
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
d	Tage (*days*)
dpi	*days post infection*
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EPS	extrazelluläre Polysaccharide
et al.	*et alii*
G	Guanin
g	Gramm
GFP	Grün-fluoreszierendes Protein
h	Stunde(n)
H_2O_{dest}	destilliertes Wasser
H_2O_{bidest}	zweifach destilliertes Wasser
HR	hypersensitive Antwort (*hypersensitive response*)
kbp	Kilobasenpaare
kDa	Kilo-Dalton
l	Liter
lx	Lux (Beleuchtungsstärke)
MALDI-ToF MS	Matrix-unterstützte Laser Desorption/Ionisation Massenspektrometrie mit Flugzeitanalysator (*time of flight*)

Mb	Megabasen
min	Minute(n)
NBT	Nitro-Blue-Tetrazolium
NCPPB	*National Collection of Plant Pathogenic Bacteria*
NT	Nukleotid(e)
NTR	nicht-translatierte Region
Ω	Ohm
oD_{580}	optische Dichte bei 580 nm
ori	*origin of replication*
P	Promotor
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAMP	*pathogen associated molecular pattern*
PAP	Probenauftragspuffer
PBS	*phosphate buffered saline*
PCR	Polymerasekettenreaktion
PR	*pathogen related*
PVDF	*polyvinylidene fluoride*
RNA	Ribonukleinsäure (*ribonucleic acid*)
rpm	*rounds per minute*
sek	Sekunde(n)
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SS	Sekretionssystem
T_A	*Annealing*-Temperatur
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TCA	Trichloressigsäure
TE	Tris-EDTA
t_E	Elongationszeit
TEMED	N,N,N‘,N’-Tetramethyl-ethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
V	Volt
v/v	*volume per volume*
w/v	*weight per volume*
Wt	Wildtyp